

Thaís Barbosa Alberti

**DESENVOLVIMENTO DE NANOMATRIZES DE
ÁLCOOL POLIVINÍLICO E PRÓPOLIS COM
APLICAÇÃO EM CICATRIZAÇÃO DE PELE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à disciplina BIO
7016 como requisito parcial para
a obtenção do grau de Bacharel
em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Prof. Dra. Maria
Beatriz da Rocha Veleirinho

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alberti, Thaís

Desenvolvimento de nanomatrizes de álcool polivinílico e
própolis com aplicação em cicatrização de pele / Thaís
Alberti ; orientadora, Maria Beatriz da Rocha Veleirinho
Florianópolis, SC, 2016.
83 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Bioquímica. 3. Nanomateriais.
4. Plantas medicinais. I. da Rocha Veleirinho, Maria
Beatriz . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.


Thaís Barbosa Alberti

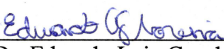
**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES NANOFIBROSAS DE
ÁLCOOL POLIVINÍLICO COM PRÓPOLIS PARA
CICATRIZAÇÃO**

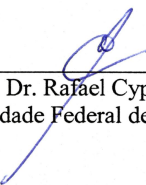
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Graduação de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:


Dr.^a Maria Beatriz da Rocha Veleirinho
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à minha mãe, por
sempre acreditar nos meus sonhos e
me estimular a segui-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Prof^a. Dr^a. Maria Beatrizda Rocha Veleirinho por toda a orientação e contribuições à minha vida acadêmica e por me apresentar ao mundo da nanotecnologia. Também ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin por ter aberto as portas do laboratório para que eu pudesse realizar o meu trabalho e me ajudar a descobrir pelo o quê os sinos tocam.

Aos colegas e professores dos laboratórios do LMBV pelo apoio e ajuda quando necessário. Em especial à Letícia Mazzarino e a Heloísa Pitz por todos os ensinamentos na minha chegada ao laboratório. Também à Simone Fanan pelo treinamento na cultura celular e acompanhamento ao longo do meu trabalho. À Ana Voytena por sua disponibilidade e auxílio principalmente na área das nanoemulsões. Eu não teria conseguido sem o Manuel de Prá, que colaborou em todo o meu trabalho com sua orientação e na parte experimental.

À Aline Caron, que foi minha primeira mentora e fez eu me apaixonar por farmacologia e neurociência. Obrigada por tudo o que você me ensinou e pela sua amizade até hoje.

Ao Rafael Dutra por sua orientação no meu primeiro projeto, que rendeu ótimos frutos. Obrigada por acreditar no meu potencial e fazer eu utilizar o máximo dele. Agradeço também a todos os colegas do LAFEX e por todo o aprendizado proporcionado lá.

Ao CNPq pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de PIBIC 445401/2014-1 durante todo o período de meu estágio no laboratório.

Ao programa Ciência Sem Fronteiras, à University of Western Australia e à Austrália por ter me proporcionado a melhor experiência acadêmica que eu poderia ter, e aos amigos que fiz lá agradeço pelo companheirismo e por ter tido uma vida em um ano. Espero que vocês fiquem pela vida toda, *mates*!

À Máira Toscano, porque sem você talvez eu não estivesse fazendo biologia. Obrigada por ter me ajudado nos momentos mais difíceis e acompanhado minhas conquistas.

À UFSC e à Florianópolis pela experiência maravilhosa que foi cursar ciências biológicas. A minha turma de 2010.1 e aos amigos da biologia pelo companheirismo durante todos esses anos; Principalmente aos remanescentes, companheiros de desespero e alegria do fim do curso. À Alessandra Junqueira, por ter entrado na minha vida na biologia. Ao Rodrigo Fantinati, por todos os colos e alegrias ao longo desses anos. À Gabrielle Almeida, por ter me mostrado outro lado de Floripa e agitado minha vida desde pequenininha.

Por todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, mesmo que não estejam mais presentes, vocês me ajudaram a me tornar o que eu sou e nada disso teria acontecido sem vocês.

“Last, but not least”, agradeço e dedico esse trabalho aos meus pais e à minha família. Eu não teria conquistado o que eu conquistei sem o apoio e o amor de vocês. Minhas idas pra Brasília e Curitiba e almoços de domingo me abasteceram para terminar minha universidade em Floripa e concluir este trabalho. Mãe, eu dediquei este trabalho a você, não só porque você me deu a vida e me financiou ao longo dela, mas por ter sido uma mãe incrível, me dado apoio de todos os jeitos possíveis, por nunca diminuir os meus sonhos e sempre acreditar em mim. Todas as minhas conquistas são uma vitória sua.

Obrigada, amo vocês!.

“Uma mente necessita de livros da mesma forma
que uma espada necessita de uma pedra de amolar
se quisermos que se mantenha afiada”

(George R.R. Martin, 1996)

RESUMO

Quando ocorre uma lesão tecidual, biomateriais podem ser utilizados como alicerces para o crescimento celular, desempenhando o papel da matriz extracelular e, desta forma, guiando o processo de regeneração do tecido. A engenharia de tecidos e a nanotecnologia têm desenvolvido nanomatrizes poliméricas fibrosas para a regeneração tecidual. Recentemente, o *electrospinning* se popularizou como técnica de criação de nanomatrizes, graças à sua capacidade e versatilidade de produção de materiais micro e nanofibrosos a partir de soluções de poliméricas. Por outro lado, a própolis é conhecida por suas diversas propriedades biológicas, principalmente por acelerar o processo de regeneração tecidual por sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória. Nesse contexto, este trabalho buscou o desenvolvimento de um curativo polimérico nanofibroso de álcool polivinílico (PVA) e própolis e avaliação *in vitro* do seu potencial em cicatrização. A combinação entre o polímero sintético e os compostos naturais podem potencializar o efeito cicatrizante da nanomatriz.

A otimização das condições experimentais do sistema para o objetivo do estudo foi feita com base na avaliação da estabilidade do processo de *electrospinning* e na morfologia das fibras formadas. Diferentes sistemas de solventes foram testados para a solubilização da própolis. As nanomatrizes resultantes foram avaliadas através de ensaios de cultura celular, utilizando uma linhagem de fibroblastos como modelo. PVA de peso molecular 89-98 kDa foi selecionado e uma solução aquosa 15% m/V foi preparada. As condições de processamento do *electrospinning* foram otimizadas: fluxo de infusão a 0,02 mL/min,

diferença de potencial de 20 kV, distância da agulha ao coletor de 12 cm e rotação de 200 rpm. Soluções de PVA 15% foram também preparadas usando H₂O/EtOH em diferentes proporções, PEG e nanoemulsão, visando a solubilização da própolis.

As matrizes de PVA:EtOH não apresentaram morfologia fibrosa adequada e a matriz de PVA:PEG foi citotóxica para os fibroblastos. Por outro lado, as nanomatrizes com nanoemulsão apresentaram morfologia adequada e baixa citotoxicidade. A nanoemulsão de própolis apresentou um efeito estimulante no crescimento de fibroblastos, sendo que para a dose de 0,01 mg/mL, a viabilidade celular aumentou 50% em relação ao controle. Além disso, a matriz não apresentou citotoxicidade indireta e houve adesão e crescimento celular sobre as suas fibras.

Os resultados mostram que a matriz de PVA associada à nanoemulsão de própolis demonstrou potencial para ser aplicada em regeneração tecidual. Além disso, este trabalho apresenta como inovação o desenvolvimento de um sistema de associação nanofibras/nanoemulsão que pode ser utilizado não apenas para o extrato de própolis, mas para qualquer sistema de nanofibras associado a extratos, especialmente os insolúveis em água.

Palavras-chave: Matrizes nanofibrosas; *electrospinning*; própolis; nanoemulsão; cicatrização.

ABSTRACT

In case of tissue injury, biomaterials can be used as scaffolds to support cellular growth, playing the role of the extracellular matrix and supporting the wound healing process. Tissue engineering and nanotechnology have developed polymeric nanofibrous scaffolds for tissue regeneration. Recently, electrospinning has become popular as a scaffold development technique, thanks to its ability to produce micro and nanofibrous materials from polymeric solutions. On the other hand, propolis is a featured natural product due to its biological properties, including enhancement of the wound healing process by its anti-inflammatory and antimicrobial activity. In this context, this study aims to develop a polymeric nanofibrous wound dressing of polyvinyl alcohol (PVA) and propolis, and to evaluate, *in vitro*, its potential in the wound healing process. The combination between the synthetic polymer and the natural compounds may enhance the scaffold's wound healing effect.

The optimization of the experimental conditions was performed based on the evaluation of both electrospinning process stability and morphology of the resulting fibers. Solubilization of propolis was tested in different solvent systems. The resulting scaffolds were evaluated through cell culture studies, using fibroblasts as model.

PVA with a molecular weight of 89-98 kDa was selected, and a 15% (w/V) aqueous solution was prepared. Processing conditions were optimised as it follows: infusion rate of 0.02 mL/min, voltage of 20 kV, distance from needle tip to collector of 12 cm and rotation of 200 rpm.

PVA solutions were also prepared using different proportions of H₂O/EtOH, PEG and nanoemulsion.

The resulting scaffolds from PVA:EtOH solutions did not present adequate fiber morphology. PVA:PEG scaffold was toxic to fibroblast cells. On the other hand, scaffolds associated with nanoemulsion showed an adequate fiber morphology. Moreover, propolis nanoemulsion stimulated fibroblasts growth, leading to an increase in viability of 50%, compared to control, with a 0.01 mg/mL dose. Furthermore, PVA scaffold associated with propolis nanoemulsion did not present any cytotoxicity and fibroblasts were able to adhere and grow on the nanofibers.

Withal, PVA scaffold associated with propolis nanoemulsion showed good potential to be applied in tissue regeneration. Furthermore, this work features as innovation the development of a nanofibers/nanoemulsion system, which can be used not only for propolis, but for any natural extract, especially for those insoluble in water.

Key-words: Nanofibrous scaffolds; electrospinning; propolis; nanoemulsion; wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação ilustrativa do processo de cicatrização. (a) Imediatamente após a lesão cutânea, elementos do sangue e aminas vasoativas extravasam da região lesada através da derme. A permeabilidade vascular é aumentada temporariamente para permitir a infiltração de neutrófilos, plaquetas e proteínas do plasma. Em seguida ocorre a vasoconstrição em resposta às citocinas liberadas por estas células. (b) A coagulação ocorre com a agregação das plaquetas com fibrina, que é depositada na lesão após sua conversão do fibrinogênio. (c) As plaquetas liberam fatores de crescimento que atraem neutrófilos, sinalizando o início da fase inflamatória. (d) Após 48 h, macrófagos substituem os neutrófilos como principal célula inflamatória. Juntos eles removem os debris da lesão, secretam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da MEC. (e) A proliferação inicia cerca de 72h, assim que os fibroblastos iniciam a síntese de colágeno. (f) Apesar da síntese de colágeno diminuir após a terceira semana, o *crosslinking* de colágeno e a reorganização ocorrem até meses após a lesão durante toda a fase de remodelação (Adaptado de Beanes et al., 2003)27

Figura 2 - Representação esquemática do sistema de *electrospinning*. A solução polimérica é bombeada através da bomba de seringa. A agulha é conectada a uma fonte de alta voltagem, que injeta uma carga no polímero. A força eletrostática criada pela repulsão das cargas iguais fica maior que a tensão superficial da solução polimérica. Um cone de Taylor se forma e o jato é emitido do seu ápice. *Splays* são formados

pela ramificação do jato até sua chegada ao rolo coletor. (Adaptado de Sill et al., 2008)	36
Figura 3 - Imagem de MEV mostrando a morfologia de nanofibras de PET obtidas por <i>electrospinning</i> (A)500x (B) 1500x.....	37
Figura 4 - Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão (Adaptado de Sanghui e Singh, 2012).	46
Figura 5- Imagens de MEV de fibras de PVA de diferentes pesos moleculares:(A) 130 kDa (B) 85-125 kDa (C,D) 89-98 kDa.....	59
Figura 6 - Imagens de MEV de nanofibras produzidas por <i>electrospinning</i> a partir de soluções de PVA (concentração15% (m/V) em água) de PM 89-98 kDa.	59
Figura 7- Imagens de MEV da formação de fibras das soluções teste de PVA:EtOH 9:1 A, B e C; PVA+PEG 1% (D) e PVA+PEG 2% (E)....	62
Figura 8 - Distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão de própolis obtidos por espalhamento de luz dinâmico	64
Figura 9 - Imagens de MEV das nanomatrizes PVA (T1), PVA/EtOH 9:1 (T2), PVA/EtOH 9:1 C com própolis (T3), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7).....	66

Figura 10 - Imagens de MEV da nanomatriz padrão de PVA (T1)67

Figura 11 - Fibroblastos 3T3 cultivados em nanomatrizes de PVA (T1), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7) e por 48h, com núcleos (azul) e F-actina (vermelho) marcados por faloidina e DAPI, respectivamente71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico do tipo *scatter-plot* mostrando os diâmetros (nm) médios e desvio padrão das fibras das nanomatrizes de PVA (T1), PVA/EtOH 9:1 (T2), PVA/EtOH 9:1 C com própolis (T3), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7).....67

Gráfico 2 - Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de citotoxicidade oral aguda de células 3T3 por NRU com concentrações logarítmicas de nanoemulsão própolis (mg/mL)68

Gráfico 3 - Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de citotoxicidade indireta de células 3T3 cultivadas em meio de cultura DMEM controle (CTRL) e meio de cultura das nanomatrizes de PVA (T1), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7)69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização. (Adaptado de Broughton et al., 2006).....	25
Tabela 2 - Avanços no tratamento de lesões teciduais (Adaptado de Toppo e Pawar, 2015)..	31
Tabela 3 - Efeito dos parâmetros do processo de <i>electrospinning</i> na morfologia das fibras resultantes (Adaptada de Pham et al., 2006).....	37
Tabela 4 - Solubilidade e formação de fibras de PVA com própolis em diferentes sistemas de solventes. (<i>Electrospinning</i> com rotação 200 rpm, voltagem de 20 kV, fluxo 0.02mL/min).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DL₅₀ - Dose letal 50%

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF- Fator de crescimento epidérmico

ES - *Electrospinning*

FGF - Fator de crescimento derivado dos fibroblastos

HEPES - Ácido N-(2- hidroxietil)piperazina-N'-2-
etanossulfônico

IC₅₀ - Concentração inibitória 50%

IL-1 - Interleucina 1

kDa - Kilodalton

MEC - Matriz extracelular (ECM - *Extracellular matrix*)

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura (SEM – *Scanning
electron microscopy*)

NR - *Neutralred* (Vermelho neutro)

NRU - *NeutralRed Uptake* (Captação de vermelho neutro)

PDGF -Fator de crescimento derivado das plaquetas

PEG - Polietilenoglicol

PM - Peso molecular (MW - *Molecular weight*)

PVA - Álcool polivinílico

SFB - Soro fetal bovino

TGF- α - Fator de crescimento de transformação alfa

TGF- β - Fator de crescimento de transformação beta

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UR - Umidade relativa

UV - Ultravioleta

VEGF - Fator de crescimento derivado do endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

* valor p

< menor que

N/A não aplicavel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	O processo de cicatrização	28
1.1.1	Fatores que alteram o processo de cicatrização	30
1.1.2	Métodos que auxiliam o processo de cicatrização	33
1.2	Biomateriais	34
1.2.1	Biomateriais poliméricos	35
1.2.2	Matrizes nanofibras poliméricas	35
1.2.3	O processo de <i>electrospinning</i>	35
1.2.4	Propriedades regenerativas de matrizes nanofibras de PVA produzidas por <i>electrospinning</i>	39
1.3	Própolis	41
1.4	Nanoemulsão.....	45
1.5	Problemática e justificativa	46
2	OBJETIVO.....	49
2.1	Objetivo Geral	49
2.2	Objetivos Específicos	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	Materiais	51
3.2	Desenvolvimento e otimização de matrizes de PVA	51
3.2.1	Preparo das soluções poliméricas para produção de matrizes para <i>electrospinning</i>	51
3.2.2	Sistema de <i>Electrospinning</i>	51
3.2.3	Caracterização das matrizes	52

3.3	Associação do extrato de própolis à matriz de PVA	52
3.3.1	Preparação do extrato de própolis.....	52
3.3.2	Estratégias de associação do extrato de própolis à matriz de PVA.....	52
3.3.3	Preparação e caracterização da nanoemulsão de própolis.....	53
3.4	Estudos de cultura celular	53
3.4.1	Toxicidade oral aguda da nanoemulsão de própolis.....	54
3.4.2	Citotoxicidade indireta das nanomatrizes.....	54
3.4.3	Cultura de fibroblastos sobre matrizes nanofibrosas.....	55
3.5	Análise estatística	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1.	Desenvolvimento e otimização de matrizes de PVA.....	57
4.2.	Associação de matrizes de PVA ao extrato de própolis.....	60
4.2.1	Utilização de solventes coadjuvantes	60
4.2.2	Preparação e caracterização da nanoemulsão de própolis.....	63
4.3	Caracterização das nanomatrizes de PVA.....	64
4.4	Estudos de cultura celular	68
4.4.1	Toxicidade oral aguda da nanoemulsão de própolis.....	68
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 O processo de cicatrização

Qualquer interrupção na continuidade da pele representa uma ferida. As feridas podem variar em espessura, pois algumas lesam a pele apenas superficialmente e outras podem atingir tecidos profundos. A cicatrização da ferida consiste na restauração da continuidade do tecido. A cicatrização é um processo biológico dinâmico e complexo, que pode ser dividido em quatro fases que podem se sobrepor: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (COTRAN *et al.*, 1999). As fases da cicatrização estão representadas esquematicamente na figura 1. Todas as fases envolvem diversos tipos celulares, além de componentes extracelulares, fatores de crescimento e citocinas. Os principais fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização estão enumerados na tabela 1.

Tabela 1 - Principais fatores de crescimento envolvidos no processo de cicatrização. (Adaptado de BROUGHTON *et al.*, 2006).

Fator de crescimento	Origem	Função
TNF- α	Monócitos e Linfócitos	Proliferação de fibroblastos, quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos
TGF- α	MEC	Proliferação celular Estimula reepitelização
TGF- β	Plaquetas, MEC,	Mitogênicos para fibroblastos Formação de tecido de granulação
PDGF	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos
VEGF	Queratinócitos e macrófagos	Angiogênese e proliferação de células endoteliais
IL-1	Mononucleares	Proliferação de fibroblastos

Visando a hemostasia nos primeiros minutos, o endotélio lesado (Fig 1a) e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação (Fig 1b). Essa cascata é iniciada e as plaquetas liberam fatores de crescimento que atraem neutrófilos à ferida (Fig 1c). Estes produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos após as primeiras 24h (Fig 1d) (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os macrófagos, além da sua atividade fagocítica, secretam

citocinas e fatores de crescimento, e contribuem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (MEC), fundamentais à transição para a fase proliferativa (CAMPOS *et al.*, 2007).

A fase proliferativa (Fig 1e) é constituída por quatro etapas fundamentais: epiteliação, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Ela se inicia geralmente 96h após a lesão tecidual e se estende até o final do processo de cicatrização. Primeiro as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora. Se a membrana basal não tiver sido danificada, as células epiteliais simplesmente migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. A angiogênese é estimulada principalmente pelo TNF- α , na qual há migração de células endoteliais e formação de novos capilares. A parte final da fase proliferativa consiste na formação de tecido de granulação. Os fibroblastos precisam ser ativados para que os mesmos migrem para a região lesada e se proliferem. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (WITTE e BARBUL, 1997).

A fase de remodelação (Fig 1f) é caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização e é o principal componente da MEC dos tecidos. Estrutura-se em rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção (ROBSON *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2007).

A composição e organização da MEC influenciam em grande extensão as propriedades de um tecido, sendo possível encontrar no organismo humano uma grande diversidade de constituintes e estruturas de MEC. Na pele, a MEC é denominada lâmina basal. A lâmina basal suporta a epiderme e confere os atributos de proteção mecânica à pele. As proteínas de adesão celular encontradas na MEC conectam a célula ao ambiente externo e funcionam como uma rede de comunicação e exercem uma influência importante no comportamento celular, participando em uma série de eventos celulares tais como a adesão, a proliferação, a comunicação, a diferenciação e a morfogênese (BOUDREAU e BISSELL, 1998; LUKASHEV e WERB, 1998; BROWN, 2000).

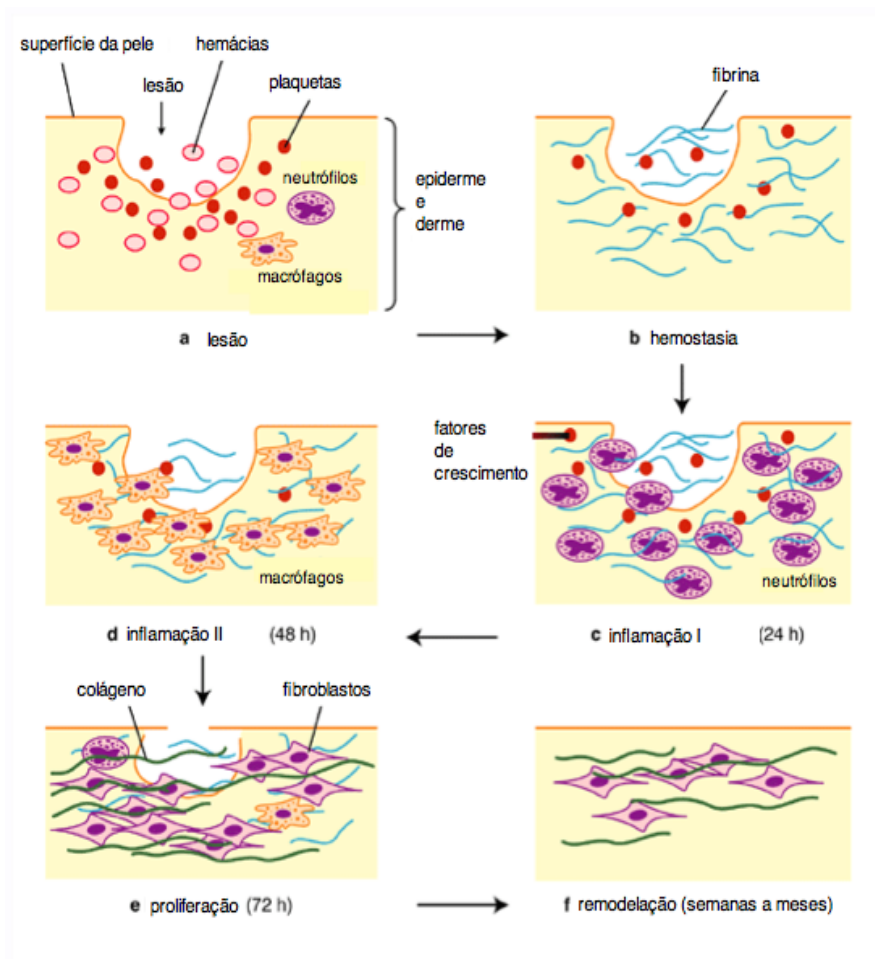


Figura 1 - Representação ilustrativa do processo de cicatrização. (a) Imediatamente após a lesão cutânea, elementos do sangue e aminas vasoativas extravasam da região lesada através da derme. A permeabilidade vascular é aumentada temporariamente para permitir a infiltração de neutrófilos, plaquetas e proteínas do plasma. Em seguida, ocorre a vasoconstrição em resposta às citocinas liberadas por estas células. (b) A coagulação ocorre com a agregação das plaquetas com fibrina, que é depositada na lesão após sua conversão do fibrinogênio. (c) As plaquetas liberam fatores de crescimento que atraem neutrófilos, sinalizando o início da fase inflamatória. (d) Após 48h, macrófagos substituem os neutrófilos como principal célula inflamatória. Juntos eles

removem os debris da lesão, secretam fatores de crescimento e iniciam a reorganização da MEC. (e) A proliferação inicia cerca de 72h, assim que os fibroblastos iniciam a síntese de colágeno. (f) Apesar da síntese de colágeno diminuir após a terceira semana, o *crosslinking* de colágeno e a reorganização ocorrem até meses após a lesão durante toda a fase de remodelação (Adaptado de BEANES *et al.*, 2003).

1.1.1 Fatores que alteram o processo de cicatrização

A pele apresenta grande capacidade de renovação e reparação tecidual, tornando a cicatrização de feridas em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares. Entretanto, a velocidade de cicatrização depende do tamanho da ferida, da maior ou menor retração da cicatriz, da quantidade de citocinas e fatores de crescimento liberados e do equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC. Além disso, vários fatores podem influenciar negativamente a cicatrização, sejam eles intrínsecos ou extrínsecos.

Mesmo indivíduos saudáveis poderão ter dificuldades no processo de cicatrização. Uma revisão sistemática comprova que todas as fases da cicatrização são afetadas pelo envelhecimento (GOSAIN e DIPIETRO, 2004). Feridas em áreas mais vascularizadas e em áreas de menor mobilidade e tensão cicatrizam mais rapidamente do que aquelas em áreas menos irrigadas ou áreas de tensão ou mobilidade. De modo geral, qualquer condição que altere o fluxo sanguíneo normal, como a isquemia tecidual e a presença de edema, podem afetar a distribuição dos nutrientes das células, assim como a dos componentes do sistema imune do corpo. Essas condições prejudicam a capacidade do organismo em transportar células de defesa, o que dificulta o processo de cicatrização (CAMPOS *et al.*, 2007; GUO e DIPIETRO, 2010). A deficiência nutricional também pode dificultar a cicatrização, pois deprime o sistema imune e diminui a qualidade e a síntese de tecido de reparação. As carências de proteína e de vitaminas são as mais importantes pois afetam diretamente a síntese do colágeno (ARNOLD e BARBUL, 2006).

Medicamentos como os corticosteróides, drogas antineoplásicas e os radioterápicos podem reduzir a cicatrização de feridas, pois diminuem a resposta imune normal à lesão, comprometendo a imunidade, aumentando a suscetibilidade à sepse e a disfunção no reparo tecidual (ROBSON *et al.*, 2001; BROUGHTON *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2007).

Algumas doenças podem dificultar a cicatrização. Há uma rara doença hereditária chamada Síndrome de Ehlers-Danlos que afeta a produção, qualidade e força do colágeno (ABAI *et al.*, 2003). Mais frequente, o hipotireoidismo altera a síntese qualitativa da MEC, diminui o colágeno tipo IV e a hidroxiprolina durante a fase proliferativa da cicatrização (NATORI *et al.*, 1999). O rompimento do equilíbrio imuno-endócrino, assim como doenças metabólicas associadas, cardiovasculares, obesidade, *stress* e diabetes aumentam os glucocorticóides e diminuem as citocinas pró-inflamatórias no local de lesões teciduais alterando a quimiotaxia necessária na fase inflamatória da cicatrização (GODBOUT e GLASER, 2006). O *diabetes mellitus* é umas das condições mais sérias em relação à dificuldade de cicatrização, pois a diabetes afeta centenas de milhões de pessoas no mundo todo e eles são propensos a desenvolver uma condição chamada úlcera do pé diabético, estimadas a ocorrer com cerca de 15% dos diabéticos. Essa complicação da diabetes precede 84% de todas as amputações de membros inferiores associados à doença. Pode afetar o processo de cicatrização por mais de um mecanismo biológico, interferindo na sinalização celular e diminuição da resposta, o que diminui o fluxo sanguíneo periférico, bem como a angiogênese local e o processo de regeneração tecidual em geral. A hiperglicemia aumenta a produção de ROS, que excedem a capacidade antioxidante do organismo; e a cascata de sinalização da insulina altera secreção de fatores de crescimento (HEHENBERGER e HANSSON, 1997; GOREN *et al.*, 2006; GUO e DIPIETRO, 2010).

A diminuição da resposta imune ocasionada por diversos fatores também pode resultar numa remoção bacteriana inadequada. A colonização bacteriana ocorre quando a ferida é mantida livre de tecido necrótico e/ou material estranho e é controlada pela ação de neutrófilos e macrófagos. Já a infecção ocorre quando há uma alta concentração bacteriana, no tecido local comprometido (escara, necrose ou corpo estranho) e há comprometimento generalizado do paciente. Bactérias e endotoxinas prolongam e elevam as citocinas pró-inflamatórias. Com o aumento da fase inflamatória, as feridas podem entrar em um estado crônico e não cicatrizar. Nas infecções de feridas por micro-organismos Gram-negativos ou em choque séptico o tecido de granulação não é formado ou pode ser destruído em excesso (EDWARDS e HARDING, 2004; GUO e DIPIETRO, 2010).

Indivíduos com alguma condição que interfere no processo de cicatrização ou que possuem feridas crônicas precisam técnicas desenvolvidas e minuciosas para auxiliar a cicatrização.

1.1.2 Métodos que auxiliam o processo da cicatrização

Uma das principais complicações da cicatrização é a infecção da ferida. Entretanto o uso de antimicrobianos pode limitar o processo de cicatrização (DREIFKE *et al.*, 2015). Ácidos graxos poliinsaturados são comumente utilizados como base para a reparação tecidual local. Mas sistemicamente eles também melhoram a função imune e diminuem chances de complicações de infecção (ARNOLD e BARBUL, 2006). O uso de substâncias antioxidantes tem sido relacionado à menor formação de radicais livres e menor dano tecidual em situações de hipóxia. Foi demonstrada maior viabilidade tecidual em grupos que receberam substâncias antioxidantes no tratamento de feridas (SEN *et al.*, 2002).

O procedimento padrão no cuidado de feridas consiste na assepsia, limpeza e aplicação de curativo para evitar ou diminuir os riscos de complicações decorrentes, bem como facilitar o processo de cicatrização. Em casos de lesões muito extensas, um procedimento comumente utilizado é o auto-enxerto. Neste método, a fáscia de uma região saudável é coletada e aplicada na região comprometida. Este tratamento apresenta desvantagens como a limitação da quantidade de pele disponível e o alto risco de complicações na região de onde a pele é retirada (DREIFKE *et al.*, 2015). Aloenxertos e xenoenxertos são uma solução temporária, mas existem vários problemas relacionados com rejeição, transmissão de doenças, disponibilidade e considerações éticas (TOPPO e PAWAR, 2015). Também existe a cultura de queratinócitos autólogos, que consiste na coleta de células, através de biópsia, expansão das mesmas *in vitro* e enxerto do epitélio cultivado na região lesionada. A taxa de sucesso dessa técnica é bastante variável (0 a 85%) e é limitada pela sua fragilidade, já que o epitélio possui apenas cerca de 6 camadas celulares, suscetíveis à destruição por mediadores presentes na ferida. Além disso, pode demorar até 4 semanas para preparar um enxerto do tamanho de um selo e queratinócitos adultos possuem potencial de proliferação limitado. Uma alternativa é o uso de células tronco, que podem se diferenciar em vários tecidos. Células tronco de diversas fontes como medula óssea, sangue periférico e umbilical já foram utilizadas no tratamento de feridas crônicas. Entretanto, a coleta de células tronco de tecidos do doador são doloridas e podem levar a morbidade da região da coleta (DREIFKE *et al.*, 2015).

No passado, curativos tradicionais, como bandagens sintéticas, fibras de algodão e gazes, tinham a principal função de manter a lesão seca pela absorção do exsudato e prevenir a entrada de bactérias.

Curativos modernos são baseados no conceito de criar um ambiente ideal para permitir que as células epiteliais se movimentem livremente, boa oxigenação, auxiliar a regeneração tecidual e diminuir a carga bacteriana. O uso de agentes farmacêuticos tópicos na forma de soluções, cremes, pomadas e drogas incorporadas nos mesmos desempenham um papel ativo na cicatrização, direta ou indiretamente por meio de agentes de desbridamento de tecido necrótico, antissépticos ou antimicrobianos ou como veículos para fatores de crescimento.

Biomateriais podem ser utilizados como veículos para liberação controlada e/ou prolongada de fármacos ou fatores de crescimento. Os curativos com sistema de liberação de drogas podem ser aplicados na forma de géis, filmes, espumas, discos porosos ou *scaffolds* fibrosos.

Tabela 2 - Avanços no tratamento de lesões teciduais (TOPPO e PAWAR, 2015).

Tipo	Características
Curativos Protetores Gaze Bandagens	Baixo custo; Remoção traumática; Migração bacteriana lateral. Acessível; Baixo custo; Boa absorção de exsudato; Deve ser trocada regularmente.
Curativo de mel	Antimicrobiano; Antifúngico; Desodorizante; Antiinflamatório; Mantém a ferida hidratada; Se dissolve rapidamente e requer reaplicação frequente.
Curativos Antimicrobianos Pomadas antibacterianas Base iodo Base prata	Requer reaplicação frequente para manter a hidratação. Absorvente; Anti-séptica; Pequenas quantidades de iodo; Ação citotóxica contra fibroblastos, queratinócitos e leucócitos; Deve ser usada apenas por curto período. Boa atividade antibacteriana de amplo espectro; Possível toxicidade sistêmica; Efetividade variável.

Desbridamento autolítico Filmes Hidrocolóides Hidrogéis	<p>Oclusivo; Permite troca gasosa. Proporciona um ambiente hipóxico e hidratado; Não deve ser utilizado para feridas infeccionadas ou com exsudato.</p> <p>Pode proporcionar hidratação para feridas secas e absorver excesso de exsudato; Atraumática se usada corretamente; Facilita autólise de tecido necrótico e não favorece crescimento microbiano.</p>
Desbridamento químico Papaína/uréia Colagenase	<p>Problemas de disponibilidade.</p> <p>Desbridamento seletivo.</p>
Curativos Absorventes Espumas Hidrogéis Hidrofibras Alginatos	<p>Pode ser feito em qualquer formato, termicamente isolante, apresenta interface úmida, Absorve excesso de exsudato, inexpugnável; Impróprio para feridas secas.</p> <p>Hidrata feridas secas; Somente pode ser usado em feridas com nenhum ou pouco exsudato. Absorve mínimo exsudato.</p> <p>Absorve bem exsudato; Impróprio para feridas secas ou que apresentem tecido necrótico.</p>
Silicone Suave	<p>Impede maceração do tecido circundante, remoção atraumática, adequado para vários tipos de lesão, pode ser utilizada para locais difíceis, pode ser deixada durante até 10 dias, pode ser impregnado com prata. Utilizado em conjunto com outro curativo absorvente secundário, exige um contacto com o local da ferida.</p>
Scaffolds <i>Scaffold</i> – material natural <i>Scaffold</i> – material sintético	<p>Biocompatível; Degradável; Baixa antigenicidade; Colágeno pode permitir a transmissão de agentes infecciosos, portanto requer boa desinfecção.</p> <p>Grande variedade de métodos de produção, <i>scaffolds</i> produzidos por <i>electrospinning</i> estimulam a adesão celular.</p>

1.2 Biomateriais

Um biomaterial pode ser definido como um material utilizado como dispositivo médico projetado para interagir com sistemas biológicos (RATNER *et al.*, 2004). Os biomateriais podem ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, incluindo metais, cerâmicas e polímeros. Eles compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde com uma ampla gama de aplicações, como diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser de uso ortopédico, cardiovascular, odontológico, oftalmológico, para cirurgia plástica, engenharia tecidual, tratamento de lesões, distúrbios neurológicos e do sistema nervoso central, além de incluir também dispositivos com outras aplicações, como gastrointestinais e urinárias, ou como sistemas de liberação de drogas e para cirurgia bariátrica (PIRES *et al.*, 2015).

No Brasil, o mercado de biomateriais foi de 690 milhões de dólares em 2010, com expectativa de crescimento até 1,7 bilhões em 2015. A área de tratamento de lesões tem crescimento esperado em torno de 24% no mesmo período (PIRES *et al.*, 2015). Neste sentido, espera-se o desenvolvimento da área de engenharia tecidual visando às aplicações no campo de medicina regenerativa. A tendência atual prevê que nos próximos anos vários biomateriais de aplicação terapêutica temporária serão substituídos por materiais biodegradáveis que possam ajudar o corpo a se regenerar e reparar os tecidos danificados (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Embora não seja possível generalizar quais as características ideais de um biomaterial, pois estas dependem fundamentalmente de sua aplicação, algumas propriedades são frequentemente avaliadas para que o projeto do dispositivo possa ser realizado de forma efetiva. Neste sentido, destacam-se propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, com frequência associada à hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas, como morfologia da superfície, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade e propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo (LLOYD, 2001; PIRES *et al.*, 2015).

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. Suas principais características incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (VILLANOVA *et al.*, 2010).

1.2.1 Biomateriais poliméricos

Polímeros são macromoléculas formadas a partir das reações de polimerização de unidades monoméricas menores de baixa massa molecular, que podem ser de origem sintética ou natural. Biomateriais de polímeros naturais possuem diversas vantagens como bioatividade, habilidade de apresentar ligantes celulares, susceptibilidade a degradação proteolítica celular e remodelação natural. Entretanto, os polímeros naturais apresentam desvantagens como resposta imunogênica associada, complexidades na sua purificação e possibilidade de transmissão de agentes infecciosos. Já biomateriais sintéticos são inertes biologicamente, têm propriedades mais previsíveis, facilitando sua padronização e direcionamento a aplicações específicas (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Polímeros podem ser utilizados em diferentes formas de apresentação e apresentar diversas funções, como por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade ou até mesmo, controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento incorporados aos dispositivos. Nas últimas duas décadas, houve o desenvolvimento de uma gama de polímeros sintéticos biodegradáveis e análogos de polímeros naturais, especificamente desenvolvidos para aplicações biomédicas. A força motriz por trás disso, em parte, se deve à emergência de novas tecnologias biomédicas incluindo: engenharia de tecidos, medicina regenerativa, terapia gênica, liberação controlada de ativos e bionanotecnologia, todas as quais requerem uma plataforma de biomateriais biodegradáveis (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Através da engenharia de tecidos e biotecnologia, as propriedades estruturais e superficiais de polímeros sintéticos podem ser aprimoradas para melhorar a função e adesão celular do biomaterial. Cientistas de engenharia de tecido buscaram na nanotecnologia, especialmente nas nanofibras, a solução para o desenvolvimento de *scaffolds* para produtos de reparação tecidual.

1.2.2 Matrizes nanofibrosas polimérica

Nanobiomateriais, uma interface entre biomateriais e nanotecnologia, se referem a uma classe especial de biomateriais com pelo menos uma dimensão na ordem dos nanômetros. A ação de uma dada quantidade de material é aumentada se ela for dividida em porções cada vez menores, aumentando a razão entre a área e o volume do material. Portanto, a escala nanométrica torna processos físicos e reações químicas mais rápidos e eficientes. A estrutura de um nanobiomaterial permite interações físicas diretas como receptores e componentes celulares, e conseqüentemente, a manipulação das células para fins terapêuticos. Particularmente, quando aplicadas à engenharia de tecidos e medicina regenerativa, são concebidas para se assemelhar aos componentes do microambiente celular ou como uma estratégia para instruir as células a alterar seu comportamento (BARNES *et al.*, 2007).

Dada a complexidade das aplicações de biomateriais poliméricos usados atualmente, não há apenas um sistema disponível considerado ideal para um biomaterial. Isso destaca a necessidade de desenvolver uma gama de biomateriais que podem corresponder aos requerimentos específicos de cada aplicação médica. Técnicas de processamento ao nível nano têm sido desenvolvidas visando mimetizar a geometria da MEC. Matrizes nanofibrosas, também denominadas por nanomatrizes ou *scaffolds* nanofibrosos, têm atraído atenção considerável à regeneração tecidual, principalmente devido à sua similaridade com a MEC.

1.2.3 O processo de *electrospinning*

Recentemente, o *electrospinning* se popularizou como técnica de criação de nanomatrizes, graças à sua capacidade e versatilidade de produção de materiais micro e nanofibrosos a partir de soluções poliméricas. Uma característica atrativa é a simplicidade e baixo custo de instalação, já que a configuração padrão de um sistema de *electrospinning* consiste numa bomba de seringa, uma fonte de alta voltagem e um coletor. Durante o processo de *electrospinning*, esquematizado na figura 2, a solução polimérica é bombeada da seringa até ponta de uma agulha. Normalmente a tensão superficial mantém a gota na ponta da agulha. Mas a aplicação de um campo elétrico utilizando a fonte de alta voltagem faz com que a carga seja no polímero, resultando repulsão eletrostática na solução polimérica. A

força eletrostática se opõe à força da tensão superficial, e eventualmente a supera, causando o início de um jato (PHAM *et al.*, 2006). Enquanto o jato percorre o trajeto até o coletor, o solvente evapora e o polímero é capturado pelo coletor na forma de fibras, cuja morfologia é ilustrada na figura 3.

O jato de *electrospinning* foi descrito em detalhe por Reneker e Chun (RENEKER e CHUN, 1996) sendo composto por quatro regiões: a base, o jato, o *splay* (ramificação) e a coleta. Na base, o jato sai da agulha formando o que é conhecido por Cone de Taylor. Nele ocorre a carga do jato, sendo que soluções com maior condutividade são mais susceptíveis a formação de jato. As forças elétricas aceleram e esticam o jato polimérico, causando a diminuição do diâmetro e aumento do comprimento da fibra. Adicionalmente, solventes com maior pressão de vapor começam a evaporar, causando diminuição no diâmetro do jato e a velocidade do processo de *electrospinning*. A carga de repulsão radial faz com que o jato se ramifique em várias pequenas fibras de, aproximadamente, igual diâmetro e taxa por unidade de medida. O diâmetro final das fibras geradas e recolhidas é dependente de quantos *splays* são criados.

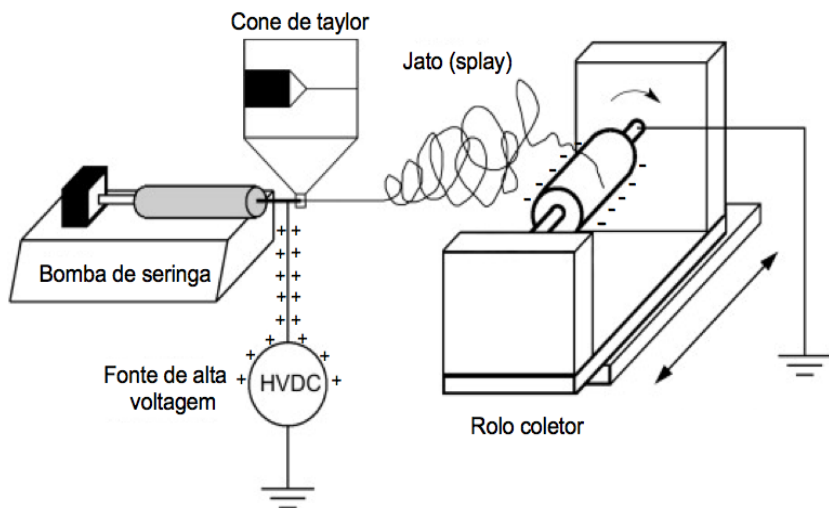


Figura 2 - Representação esquemática do sistema de *electrospinning*. A solução polimérica é bombeada através da bomba de seringa. A agulha é conectada a uma fonte de alta voltagem, que injeta uma carga no polímero. A força

eletrostática criada pela repulsão das cargas iguais fica maior que a tensão superficial da solução polimérica. Um cone de Taylor se forma e o jato é emitido do seu ápice. *Splays* são formados pela ramificação do jato até sua chegada ao rolo coletor (Adaptado de SILL e VON RECUM, 2008).

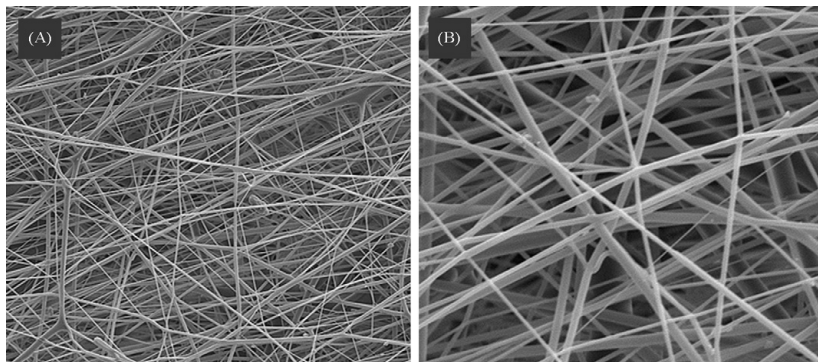


Figura 3 - Imagem de MEV mostrando a morfologia de nanofibras de PET obtidas por *electrospinning* (A) 500x (B) 1500x. Fonte: (VELEIRINHO e LOPES-DA-SILVA, 2009).

Reneker classificou os parâmetros que controlam o processo em termos de propriedades da solução polimérica, variáveis controláveis e parâmetros ambientais. Esses parâmetros podem e devem ser manipulados para se obter o tipo de fibras desejadas. A tabela 3 mostra resumidamente o efeito dos parâmetros do processo de *electrospinning* na morfologia das fibras resultantes. A otimização das propriedades intrínsecas de ativos para o *electrospinning* e as condições de processamento de cada polímero / solvente são cruciais para obter fibras com características que atendem melhor às necessidades requeridas.

Tabela 3 - Efeito dos parâmetros do processo de *electrospinning* na morfologia das fibras resultantes (Adaptada de PHAM *et al.*, 2006).

Parâmetro	Efeito na morfologia da fibra
Viscosidade e concentração	Baixas concentrações/viscosidades rendem defeitos na forma de <i>beads</i> ; aumento da concentração reduz os defeitos; Diâmetros das fibras aumentam com maior concentração/viscosidade.

Condutividade/Densidade de carga da solução	Aumento da condutividade ajuda na produção de fibras mais uniformes; Maior condutividade em geral gera fibras menores.
Tensão superficial	Não foi estabelecida relação.
Peso molecular do polímero	Aumento do peso molecular reduziu a quantidade de <i>beads</i> .
Momento de dipolo e constante dielétrica	O electrospinning foi bem sucedido com solventes com alta constante dielétrica.
Taxa de infusão	Taxas de infusão menores geram fibras com diâmetros menores; Altas taxas de infusão fazem com que as fibras não cheguem secas ao coletor.
Voltagem	Em voltagem muito alta, há formação de <i>beads</i> ; Correlação entre voltagem e tamanho de fibras é ambígua.
Distancia entre ponta da agulha e coletor	Existe uma distância mínima necessária para obtenção de fibras; Em distâncias médias, há formação de <i>beads</i> .
<i>Design</i> da ponta da agulha	Utilizando fieira-capilar coaxial pode-se obter fibras ocas; Várias agulhas podem ser usadas para aumentar o fluxo.
Composição do coletor	Coletores de metal geram fibras mais regulares; As fibras saem mais alinhadas com tambor rotativo, ou coletor de bobina redondos.
Parâmetros ambientais	Temperaturas maiores diminuem a viscosidade, resultando fibras menores; Aumento da umidade resulta no aparecimento de poros circulares nas fibras.

A manipulação da proporção do polímero, composição do solvente e peso molecular são uma maneira importante de controlar a morfologia e portanto, as propriedades e potenciais aplicações para os

matrizes nanofibras (VELEIRINHO *et al.*, 2011). Sistemas matriciais podem ser preparados a partir de polímeros solúveis em água, polímeros insolúveis erodíveis ou polímeros insolúveis inertes. Os principais polímeros naturais utilizados em matrizes são os hidrogéis de quitosana, alginato, sulfato de condroitina, gelatina, dextrina, hialuronana e poli (lisina). Exemplos de polímeros sintéticos são: poli (vinil álcool) (PVA), poli (etilenoglicol) (PEG), bisacrilamida, poli (acrilamida) (PAm), ácido poli (acrílico) (PAA), poli (ácido metacrílico) (PMAA), poli (acrilato de butila) (PBA), poli (metacrilato de metila) (PMMA), poli (N-isopropil acrilamida), polivinilpirrolidona (PVP), poli (fosfazona), poli (ácido láctico) (PLA), policaprolactona (PCL), poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA), poli (oligo(óxido de etileno) monometiléter metacrilato) (POEOMA) contendo ligações cruzadas por grupos tióis e copolímeros diversos.

O conhecimento sobre as interações celulares na superfície de polímeros facilita a estratégia do desenvolvimento de biomateriais. O PVA apresenta uma série de vantagens no desenvolvimento de matrizes nanofibras. Trata-se de um polímero sintético de grande interesse devido às suas características desejáveis na área biomédica: ótima biocompatibilidade, baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas, flexibilidade, estabilidade química e mecânica (SAILAJA *et al.*, 2009). Por ser um polímero inerte, o PVA é utilizado extensivamente como veículo à liberação de ativos, como curativos e *scaffolds* biodegradáveis. Investigações recentes de materiais híbridos de PVA incluem hidrogéis nanoestruturados como PEG (MANSUR *et al.*, 2004) ou com outras macromoléculas (ALIPOUR *et al.*, 2009; ARAMWIT *et al.*, 2010), como ácido hialurônico ou membranas de pele artificial de PVA-gelatina (PAL *et al.*, 2007).

Atualmente, apenas algumas técnicas conseguem com êxito produzir fibras, e subsequente *nanomatrizes*, na escala nanométrica (BARNES *et al.*, 2007). O *electrospinning* é a principal técnica utilizada para fabricar *scaffolds* nanofibras com morfologia uniforme e estável (AN *et al.*, 2013).

1.2.4 Propriedades regenerativas de nanomatrizes de PVA produzidas por *electrospinning*

Nanomatrizes para engenharia tecidual frequentemente associam biodegradabilidade, propriedades mecânicas e facilidade de processamento de alguns polímeros. Elas têm funções que vão muito além de prover uma matriz biocompatível com porosidade, rugosidade,

estrutura tridimensional, degradabilidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa adequadas, incluindo também a potencial estimulação do crescimento, migração, interação e diferenciação celular por meio de disponibilização às células de fatores de crescimento e outros sinais bioquímicos apropriados que podem ser neles incorporados ou adsorvidos, de forma a propiciar um microambiente que remeta à matriz extracelular. Essas matrizes têm sido aplicadas na pesquisa de regeneração de diferentes tecidos (e.g. epitelial, vascular, ósseo, neural, urinário e cardíaco) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (VILLANOVA *et al.*, 2010).

Quando ocorre uma lesão tecidual, biomateriais podem ser utilizados como alicerces ou *scaffolds* para o crescimento celular, desempenhando o papel da MEC e, desta forma, guiando o processo de regeneração do tecido. Neste contexto, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver nanomatrizes que mimetizem a estrutura da MEC e suportem o crescimento celular temporariamente, até que o organismo re-sintetize a MEC danificada. Estudos anteriores têm demonstrado um elevado potencial de aplicação das nanomatrizes como suporte para o crescimento celular (NUTTELMAN *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2008; SILL e VON RECUM, 2008; THAKUR *et al.*, 2008; CAI *et al.*, 2010; VELEIRINHO *et al.*, 2012; VELEIRINHO *et al.*, 2013; VELEIRINHO *et al.*, 2014).

Novas ideias a respeito da farmacocinética, farmacodinâmica, bioreconhecimento e eficiência de fármacos têm gerado novas estratégias de liberação de ativos através de bioativos naturais e sintéticos, como nanopartículas poliméricas. A variedade de curativos baseados no tipo de lesão e novos polímeros utilizados para a liberação controlada de fármacos oferece diferentes alvos terapêuticos no processo de cicatrização. As propriedades físico-químicas das nanofibras mostram grandes vantagens e avanços no campo da engenharia de tecidos (TOPPO e PAWAR, 2015). Nas matrizes, o fármaco encontra-se disperso no polímero e o controle da liberação pode ocorrer difusão, dissolução, hidratação, precipitação, erosão e/ou degradação. Outra perspectiva que merece destaque é a combinação entre polímeros sintéticos e macromoléculas naturais. Estes sistemas apresentam baixa toxicidade, boa estabilidade, baixo custo, biodegradabilidade específica e inúmeras possibilidades de modificações moleculares. A incorporação de compostos bioativos, pela sua dissolução diretamente na solução polimérica, é uma das grandes vantagens da técnica de *electrospinning*. Assim, é possível não só criar fibras a partir de biopolímeros funcionais, mas também incorporar

moléculas bioativas no interior destas fibras (VILLANOVA *et al.*, 2010).

1.3 Própolis

Nas últimas décadas, foi observado um aumento, em todo o mundo, no uso de produtos naturais. O uso de substâncias naturais apresenta inúmeras vantagens. As plantas apresentam diversos compostos que podem agir em alvos moleculares diferentes, ao mesmo tempo, com efeitos similares que apresentam efeitos sinérgicos. Além disso, os compostos ativos apresentam concentrações reduzidas, apresentando menores riscos de efeitos colaterais do que moléculas sintéticas (YUNES *et al.*, 2001).

A própolis, proveniente das abelhas da espécie *Apis mellifera*, é considerada atualmente um dos produtos naturais de maior destaque, conhecida por suas diversas propriedades biológicas e por ser tradicionalmente utilizada como um remédio natural desde a antiguidade. Suas propriedades medicinais eram reconhecidas pelos médicos gregos e romanos, bem como os árabes, na idade média, a utilizavam por suas propriedades cicatrizantes e como antisséptico bucal. Os egípcios a utilizavam para bálsamo devido às suas propriedades anti-putrefativas. Ela também foi reconhecida por povos como os incas, pelo seu uso antipirético. Inclusive, as farmacopéias do século XVIII a listavam como uma droga oficial. Até o século XX houve uma popularização do seu uso na Europa devido às suas propriedades antibacterianas (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Hoje em dia a própolis é usada em várias partes do mundo onde é indicada para melhorar a saúde e prevenir doenças como inflamação, doenças coronárias, diabetes e câncer. Problemas tratados com própolis incluem mau hálito (halitose), eczema, infecções na garganta, úlceras, dermatites e infecções urinárias (DOS SANTOS PEREIRA *et al.*, 2002). Atualmente, a própolis vem sendo largamente empregada na medicina popular, em cosméticos e dermocosméticos. Ela está disponível na forma de cápsulas, como um extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como enxaguatório bucal, na forma de pó, entre outras. Também é empregada em cosméticos e na indústria alimentícia na forma de alimentos funcionais (CASTALDO e CAPASSO, 2002).

Há grande interesse mundial na própolis, e considerável investigação em relação às suas propriedades farmacológicas. Já foi documentada atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipocolesterolêmica,

hipotensora, cicatrizante, anestésica, anti-cancerígena, anti-HIV e anti-cariogênica. Em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totaliza 450, oriundos de 39 países (dos cinco continentes), além de 239 patentes (DOS SANTOS PEREIRA *et al.*, 2002).

A própolis contém flavonóides e compostos fenólicos que têm sido apontados como portadores de atividade antioxidante. Esses compostos mostraram mais potencial antioxidante do que antioxidantes comumente utilizados como vitamina C, E e ácido cafeico. Portanto, reduzindo os peróxidos intracelulares, os antioxidantes têm bom potencial anticarcinogênico. Similarmente, a atividade antioxidante também parece estar relacionada à atividade imunomoduladora e hepatoprotetora (BANSKOTA *et al.*, 2001).

As abelhas utilizam a própolis para selar a colméia e prevenir a decomposição de organismos invasores mortos. Assim, considera-se que a própolis têm propriedades antimicrobianas. De fato, diversos grupos de pesquisadores comprovaram suas propriedades antimicrobianas, assim como antifúngicas e antivirais de própolis de diferentes origens geográficas (MARCUCCI, 1995).

Produtos apiários já são utilizados comercialmente como cicatrizantes. O mel de Manuka (*Leptospermum scoparium*), conhecido por suas propriedades microbianas potentes, é o mel mais conhecido a ser utilizado como curativo para feridas de diversas formas, desde géis, pomadas, curativos de tecido e hidrogéis (BOATENG e CATANZANO, 2015). A própolis é comumente utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias dermais, bem como outras doenças inflamatórias. Seu efeito anti-inflamatório é amplamente comprovado. Por exemplo, edema de pata induzido por carragenina foi significativamente inibido pelo extrato de própolis à dose oral de 100mg/kg (PARK *et al.*, 1996). O extrato etanólico de própolis também suprimiu prostaglandinas e geração de leucotrienos por macrófagos murinos *in vitro* e durante inflamação induzida por zymosan *in vivo*. Além disso, foram apresentados efeitos estimulantes na proliferação de macrófagos (BANSKOTA *et al.*, 2001). O uso da própolis em feridas diminuiu o tempo de cicatrização, acelerou o processo de regeneração tecidual e ofereceu recuperação dos tecidos lesionados por sua ação antimicrobiana e antiinflamatória (LUSTOSA *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009). Além da cicatrização em humanos e animais saudáveis, a aplicação do extrato de própolis acelerou a cicatrização em modelo murino de diabetes (MCLENNAN *et al.*, 2008).

Nesta perspectiva, a própolis é sugerida como produto que favorece a cicatrização, além de sua propriedade antibiótica natural com efeitos colaterais limitados, o que não acontece com os antibióticos sintéticos. A própolis tem baixa toxicidade aguda oral, com LD₅₀ variando de 1000 a 7300 mg/kg em camundongos (PARK *et al.*, 1996). A própolis é considerada segura, sendo que efeitos adversos foram reportados em doses acima de 15 g/dia (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Contudo, as dosagens necessárias são quase 100 vezes menores do que isso. Por exemplo, a dose recomendada para própolis como suplemento oral é de 200 mg/dia. Entretanto, já foram documentadas na literatura diferentes posologias e vias de administração de própolis para o tratamento de lesões teciduais. O uso combinado de mel, própolis e mirra cicatrizou feridas profundas e infeccionadas de pacientes diabéticos com aplicação diária de 800 mg de extrato de própolis na pasta de uso tópico combinado com 400 mg/dia via oral (LOTFY *et al.*, 2006). Já uso tópico de própolis em pacientes com úlcera de pé diabético diminuiu o tempo de cicatrização com aplicação única de solução aquosa de 400mg/mL de própolis (HENSHAW *et al.*). Em camundongos diabéticos, tratamento com dose única de 400 mg/mL de própolis também diminuiu o tempo de cicatrização (MCLENNAN *et al.*, 2008). As respostas de reparação tecidual também foram maiores em camundongos tratados oralmente com extrato aquoso de própolis verde de 500 mg/kg quando implantados com discos de esponja de poliéster e poliuretano (MOURA *et al.*, 2011). As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas à sua composição química, e este possivelmente é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região e época da colheita.

Por ser uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores, a composição da própolis depende diretamente das espécies botânicas encontradas na região da sua coleta. Diversas vitaminas, minerais e mais de 300 compostos químicos já foram identificados em amostras de própolis (MARCUCCI, 1995), sendo que diversas novas substâncias têm sido identificadas (BANSKOTA *et al.*, 2001).

A principal fonte botânica da própolis de zonas temperadas (Ásia, Europa e América do Norte) contém brotos de álamo, plantas do gênero *Populus* spp (MARCUCCI, 1995). Já as própolis de zonas tropicais (América do Sul e Oceania) diferem das própolis temperadas principalmente pela ausência de brotos de álamo, biodiversidade e

composição química diferente. A própolis verde, produzida no Brasil, possui destaque mundial. Esse interesse se deve principalmente a marcadores químicos abundantes nesse tipo de própolis, como os prenilpropanóides prenilados, principalmente os derivados do ácido cinâmico. Dentre eles, o artepillin C merece maior atenção por possuir um alto valor agregado especialmente no mercado do Japão devido às suas propriedades antimicrobianas (AGA *et al.*, 1994) e antitumorais. Além disso, fenólicos, flavonóides, mono e sesquiterpenos são frequentemente detectados na própolis brasileira, contribuindo para suas características químicas e atividades biológicas (SALATINO *et al.*, 2005).

Uma tentativa de classificar as própolis produzidas no Brasil de acordo com sua origem botânica e composição química reconheceu 12 tipos. Cinco delas são da região sul, uma da região sudeste e seis na região nordeste do país (PARK *et al.*, 2000). *Araucaria* spp, *Eucalyptus* spp, *Baccharis* spp são apontadas como algumas das principais fontes botânicas da própolis brasileira (SALATINO *et al.*, 2005). Ainda não há extensa caracterização química na própolis do sul do Brasil, entretanto os marcadores químicos da região de Santa Catarina já foram avaliados e foram encontradas diferenças entre as regiões serranas e costeiras (MARASCHIN *et al.*, 2012). A própolis do sudeste de Santa Catarina, na região de São Joaquim, demonstrou abundância de compostos fenólicos e flavonóides e foi associada com atividade angiogênica (MENEGHELLI *et al.*, 2013). Apesar da diferença em seus constituintes, própolis de todas as regiões, inclusive regiões temperadas e tropicais, exibem propriedades biológicas semelhantes (MARCUCCI, 1995).

Devido à própolis ser uma mistura muito complexa de substâncias de polaridade variada dificilmente encontra-se um único solvente que extraia todos os componentes de interesse. O extrato etanólico de própolis resulta num produto com melhores características funcionais e quantidade de substâncias fenólicas por volume de extrato (PARK *et al.*, 1998). O melhor sistema de solvente é o etanol hidratado, na proporção de etanol 70%, no qual a maioria dos compostos ativos são extraídos, mas não as ceras (BANKOVA, 2005). De modo geral, a própolis contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen (GHISALBERTI *et al.*, 1978). Isso torna o material caracteristicamente lipofílico, duro e quebradiço quando frio, mas macio, maleável, e muito pegajoso quando quente. A própolis bruta contém substâncias solúveis em óleo ou em água e também solúveis nestes dois solventes. Entretanto, a maioria dos

componentes da própolis é solúvel em óleo, por isso, o método de extração de própolis mais utilizado emprega o álcool etílico hidratado como solvente. A própolis apresenta baixa solubilidade em água, em razão das características apolares da maior parte das substâncias que a compõem.

No mercado, a maioria dos extratos e tinturas disponíveis é produzida à base de álcool, que pode provocar reações adversas e contra indicações (SFORCIN e BANKOVA, 2011). Por outro lado, a adição de um tensoativo ou qualquer outra substância com uma extremidade polar e a outra formada por uma cadeia parafínica longa, pode diminuir a tensão interfacial entre as substâncias presentes na própolis e o meio ajudando a solubilizá-las (KONISHI *et al.*, 2004).

1.4 Nanoemulsão

A nanoemulsão é uma estratégia para solubilizar drogas lipofílicas e melhorar a biodisponibilidade de drogas. Ela possui vantagens de não ser tóxica ou dermoirritante; ter boa estabilidade física, maior superfície de contato e, portanto maior absorção. Além de ser um modo avançado de liberação de ativos que foi desenvolvido para superar as principais desvantagens associadas com os sistemas de liberação de ativos convencionais.

O termo nanoemulsão se refere a uma miniemulsão na qual a dispersão de óleo/água e água/óleo é estabilizada por uma interface de filme ou moléculas surfactantes. É um sistema termodinamicamente instável, que pode ser estabilizado na presença de um agente emulsificante. As gotículas de uma emulsão são moléculas que podem ser carreadoras que consistem em esferas sólidas e sua superfície é amorfa e lipofílica com carga negativa. Uma emulsão é um sistema bifásico no qual uma fase é intimamente dispersa na outra fase na forma de gotículas com diâmetro variando de 0,1 a 100 µm. A maior diferença entre emulsão e nanoemulsão está no tamanho das partículas dispersas na fase contínua. O tamanho da gotícula da nanoemulsão tipicamente fica na faixa de 20–200 nm (JAISWAL *et al.*, 2015).

Uma nanoemulsão de A/O ou O/A pode ser preparada de diversas maneiras. Uma delas é a emulsificação espontânea. Ela envolve três passos: a preparação de uma solução orgânica homogênea - consistindo de óleo e um surfactante lipofílico em um solvente aquoso com surfactante hidrofílico, em seguida, a injeção da fase orgânica é na fase aquosa sob agitação magnética contínua; e quando a emulsão O/A é

formada, então o solvente orgânico é removido através da evaporação sob pressão reduzida.

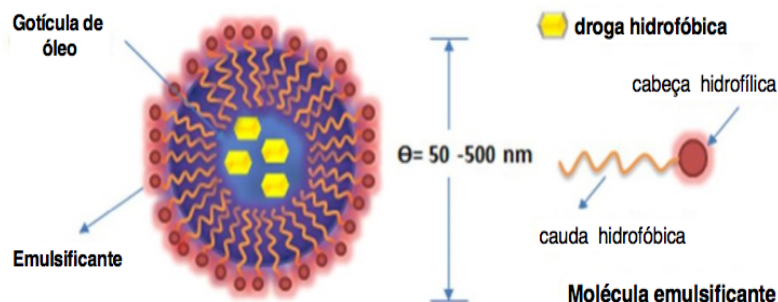


Figura 4 - Representação esquemática de gotícula de nanoemulsão O/A (Adaptado de SANGHI e SINGH, 2012).

1.5 Problemática e justificativa

Tendo em vista a busca de curativos modernos que possam auxiliar a regeneração tecidual, nesse trabalho pretende-se desenvolver uma nanomatriz para a o tratamento de feridas de pele. Dentre os biomateriais que vêm sendo amplamente utilizados na área biomédica, os poliméricos apresentam mais vantagens. A engenharia de tecido encontrou nas nanofibras uma alternativa promissora para o desenvolvimento de nanomatriz para produtos de reparação tecidual. Eles apresentam elevada semelhança morfológica e dimensional com a MEC, o que os torna atrativos para o suporte e crescimento celular. O *electrospinning* é a principal técnica de criação de matrizes nanofibrosas a partir de soluções poliméricas.

O PVA foi escolhido como polímero por sua biocompatibilidade e possibilidade de associação com compostos naturais, e.g. extratos fitoterápicos. A própolis foi selecionada devido ao seu destaque no mercado brasileiro e mundial por suas amplas propriedades biológicas e efeitos comprovados na regeneração tecidual, além de suas propriedades antimicrobiana e antiinflamatória. Por ser um material caracteristicamente lipofílico, a nanoemulsão de própolis foi adotada como solução para sua solubilização e potencializar sua liberação.

Nesse contexto, a hipótese do presente trabalho considera que o uso de matrizes nanofibrosas à base de PVA auxilia o processo de regeneração tecidual. Além disso, assume-se que o efeito cicatrizante das nanomatrizes será potencializado com a associação com o extrato de própolis. Tendo em vista esta perspectiva, este trabalho é a primeira etapa do desenvolvimento de um protótipo de curativo nanofibroso para regeneração tecidual em indivíduos com cicatrização comprometida. Os resultados obtidos permitirão obter um material apto a ser testado em ensaios pré-clínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um curativo polimérico nanofibroso de álcool polivinílico (PVA) e própolis e avaliar *in vitro* o seu potencial no tratamento de lesões cutâneas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Produzir, através da técnica de *electrospinning*, e caracterizar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) matrizes poliméricas nanofibrosas baseadas em PVA;
2. Definir um protocolo à produção de matrizes nanofibrosas uniformes quanto à composição e diâmetro das fibras, tendo em vista a aplicação pretendida, via seleção adequada dos sistemas polímero/solvente e condições de processamento (*electrospinning*);
3. Desenvolver um protocolo para associação de extratos de própolis a matrizes nanofibrosas de PVA;
4. Avaliar *in vitro* a citotoxicidade indireta e toxicidade oral aguda das formulações de própolis e das nanomatrizes, utilizando como modelo fibroblastos embrionários murinos da linhagem BALB-c 3T3.
5. Avaliar, através de técnicas microscópicas, o potencial das nanomatrizes como substrato para adesão e crescimento celular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os polímeros e solventes utilizados neste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Company, e os materiais para cultura celular da Invitrogen Thermo Fischer Scientific (Invitrogen Grand Island, NY, USA).

3.2 Desenvolvimento e otimização de matrizes de PVA

Para o desenvolvimento e otimização das nanomatrizes de PVA foram realizados uma série de ensaios utilizando amostras de PVA com diferentes pesos moleculares (31-50 kDa, 130 kDa, 85-125 kDa e 89-98 kDa). Para cada uma das amostras foram avaliadas 4 concentrações do polímero em solução aquosa (10, 15, 20 e 30% m/V). Foram também estudados os efeitos da variação dos parâmetros do sistema de *electrospinning* (distância da agulha ao coletor, diferença de potencial, fluxo de infusão e rotação do coletor). A otimização das condições experimentais do sistema para o objetivo do estudo foi feita com base na avaliação da estabilidade do processo de *electrospinning* e na morfologia das fibras, conforme posteriormente descrito.

3.2.1 Preparo das soluções poliméricas para produção de matrizes por *electrospinning*

Para a produção de matrizes por *electrospinning*, 20 mL de soluções de PVA foram preparadas (10, 15, 20, 30% m/V) em banho-maria a 90°C e mantidas sob agitação magnética até completa dissolução do polímero.

3.2.2 Sistema de *electrospinning*

As matrizes foram obtidas através de um sistema de *electrospinning* constituído por uma fonte de alta voltagem (Spellman CZE 1000R), uma bomba de infusão (Harvard *apparatus* PHD 2000), uma seringa com agulha metálica e rolo coletor metálico com velocidade de rotação ajustada para 200 rpm. Os procedimentos experimentais foram realizados à temperatura e umidade ambientes (aproximadamente 25°C e 75% U.R.). Os parâmetros utilizados no

sistema de *electrospinning* para produção de matrizes de PVA foram otimizados.

3.2.3 Caracterização das matrizes

A morfologia das matrizes foi avaliada via microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM-6390LV). Para determinação do diâmetro médio das nanofibras foram obtidas 3 imagens em regiões distintas da matriz e efetuadas medições de diâmetro (n=100) utilizando o *software* Image J (Image J 1.37c, Wayne Husband, National Institute of Health, USA).

3.3 Associação do extrato de própolis à matriz de PVA

3.3.1 Preparação do extrato de própolis

A amostra de própolis utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo professor Marcelo Maraschin. A amostra, coletada no município de São Joaquim (28° 17' 38"S 49° 55' 54"W), foi previamente caracterizada pelo grupo e selecionada para este trabalho por sua baixa citotoxicidade.

O extrato de própolis foi preparado usando como solvente extrator uma solução de etanol 70%, na proporção de 0,2 g de própolis seca por mL de solvente. A extração foi realizada *overnight*, em temperatura ambiente e, em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo. A solução obtida foi seca sob atmosfera de nitrogênio, em capela de exaustão, de modo a obter o extrato seco de própolis.

3.3.2 Estratégias de associação do extrato de própolis à matriz de PVA

A associação do extrato de própolis à nanomatriz polimérica foi feita por adição do extrato hidroalcoólico seco à solução polimérica. Assim, durante o processo de *electrospinning* os compostos provenientes do extrato de própolis ficam incorporados no interior das nanofibras. Com base no cálculo da concentração descrita na literatura por área de lesão experimental e extrapolação para a área total da nanomatriz, a concentração pretendida de própolis na solução de PVA é de 1,25 mg/mL. No entanto, como o extrato em questão não se solubilizou na solução de PVA em água, diferentes estratégias foram adotadas, conforme descrito em seguida:

A- Preparação da solução de PVA em misturas H₂O/EtOH(1:9, 2:8, 3:7, 5:5, 7:3, 8:2 e 9:1 V/V). Posteriormente, o extrato de própolis foi adicionado à solução polimérica e mantido sob agitação magnética *overnight*. Após solubilização completa do extrato a solução foi submetida ao processo de *electrospinning*.

B -Solubilização prévia do extrato seco de própolis em misturas H₂O/EtOH, seguida da adição e solubilização do PVA. Após dissolução completa a solução foi submetida ao processo de *electrospinning*.

C -Utilização de PEG (PM: 400 kDa) como solvente do extrato de própolis, sendo esta posteriormente adicionado à solução padrão de PVA de modo a obter concentrações finais de PEG de 1 e 2 % m/V. Após dissolução completa, a solução foi submetida ao processo de *electrospinning*.

D-Preparação de nanoemulsão de própolis, a qual foi posteriormente adicionada à solução polimérica padrão de PVA. Após dissolução completa a solução final foi submetida ao processo de *electrospinning*. Este procedimento será descrito no tópico seguinte.

3.3.3 Preparação e caracterização da nanoemulsão de própolis

As nanoemulsões de própolis foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea, utilizando 0,4% de poloxamer (Kolliphor P188) na fase aquosa e 2 mg/mL de lecitina na fase oleosa, composta por acetona e etanol na proporção de 60:40. O extrato hidroalcolico de própolis seco foi solubilizado na fase orgânica, e sua concentração final da nanoemulsão foi de 16,6 mg/mL, após evaporação da fase orgânica em rotaevaporador. O tamanho médio de partícula e índice de polidispersão foram medidos a 25°C por espectroscopia de correlação de fótons utilizando um Malvern Nanosizer/Zetasizer® nano-ZS ZEN 3600.

3.4 Estudos de cultura celular

Células de fibroblasto murinas da linha 3T3 foram cultivadas com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) e suplementadas com soro fetal bovino (SFB) 10%, 10 mM HEPES, 2mM L-glutamina, 100 units/mL penicilina e 100 g/mL streptomomicina. O meio foi trocado a cada 48h e as células foram mantidas em cultura a 37°C, e atmosfera úmida a 5% CO₂. Quando as células atingiam confluência, eram tratadas com 0,25% de tripsina com 1mM EDTA e contadas em câmara de Neubauer. Para os ensaios de cultura celular, as

nanomatrizes foram previamente dimensionadas, esterilizadas com radiação UV (30 minutos em cada face) e deixadas *overnight* em meio de cultura antes do plaqueamento.

3.4.1 Toxicidade oral aguda da nanoemulsão de própolis

O ensaio de toxicidade oral aguda foi realizado por Captação de Vermelho Neutro (*Neutral Red Uptake* - NRU), segundo o protocolo OECD n. 129 (OECD, 2010). Foram plaqueadas 10^4 células por poço em placa de 96 poços, e após incubação de 24h a 37°C, o tratamento foi realizado em 8 concentrações da nanoemulsão em escala logarítmica. Uma placa foi tratada com a solução-teste, uma branca e uma com dodecil sulfato de sódio (SDS) nas mesmas concentrações. Após 48h de incubação com o tratamento, a placa foi lavada com 100µl PBS, corada com 100 µl de solução de corante de vermelho neutro (NR) (25 µg/mL) em DMEM e incubada por 3h. O meio contendo a solução de NR foi retirado, lavado com 100µl de PBS e adicionada 100µl de solução de dessorção (49 partes H₂O + 50 EtOH + 1 ác. acético glacial). As placas foram lidas em espectrofotômetro a 540nm.

3.4.2 Citotoxicidade indireta das nanomatrizes

O ensaio de citotoxicidade indireta foi uma adaptação do ISO/IEC 10995-5 (2008) realizado de acordo com a metodologia descrita por (VELEIRINHO *et al.*, 2013). Brevemente, discos de nanomatrizes (4 mm de diâmetro) foram colocados em placa de 96 poços e incubados em meio de cultura a 37°C por 24 h para o preparo do meio de extração (100µl/poço).

As células 3T3 foram plaqueadas (2×10^3 células/poço) em nova placa e após período de adesão celular de 24 h, o meio foi removido e substituído pelo meio de extração. Após 24 h, o meio de extração foi removido e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de NRU. Após 48h de incubação com o tratamento, a placa foi lavada com 100µl PBS, corada com 100 µl de solução de corante de vermelho neutro (NR) (25 µg/mL) em DMEM e incubada por 3h. O meio contendo a solução de NR foi retirado, lavado com 100µl de PBS e adicionada 100 µl de solução de dessorção (49 partes H₂O + 50 EtOH + 1 ác. acético glacial). As placas foram lidas em espectrofotômetro a 540nm.

3.4.3 Cultura de fibroblastos sobre matrizes nanofibrosas

A morfologia e adesão celular dos fibroblastos às nanomatrizes foi analisada microscopicamente por microscopia de fluorescência e MEV. Assim, células 3T3 foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células/poço sobre nanomatrizes estéreis em placa de 6 poços e incubadas durante 48 h.

Para análise por microscopia de fluorescência, as células foram lavadas uma vez com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS por 20 minutos. Em seguida foi efetuada a marcação de filamentos de actina com Alexafluor 546 conjugado com faloídina (A22283, Invitrogen) 300 µl 1:20 em PBS, por 60 minutos no escuro. Após lavar com PBS uma vez, o DNA das células foi corado com 1 mL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 5:1000 em PBS, durante 5 minutos. Após lavagem com PBS, três vezes, a nanomatriz contendo as células foi cuidadosamente retirada do poço e montada em lamina/lamínula para observação no microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i) acoplado à câmera Nikon Digital Sight DS-Fi2.

3.5 Análise estatística

Para avaliar os resultados dos diferentes tratamentos nos estudos propostos neste projeto, foram realizadas análises de variância (ANOVA, nos casos paramétricos e Kruskal-Wallis nos casos não-paramétricos). Onde $*p < 0,05$ é considerado estatisticamente relevante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e otimização de matrizes de PVA

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver um protótipo de curativo, composto por uma estrutura polimérica nanofibrosa associada ao extrato bioativo de própolis. O PVA foi escolhido para o desenvolvimento deste novo material, devido à possibilidade de produção de fibras por *electrospinning* a partir de solução aquosa, i.e., sem uso de solventes orgânicos que poderiam prejudicar a estrutura dos compostos bioativos provenientes da própolis. Por ser um polímero inerte, o PVA é utilizado em aplicações de liberação de ativos e curativos. Este polímero sintético possui várias características desejáveis na área biomédica, e.g. ótima biocompatibilidade, baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas, flexibilidade, estabilidade química e mecânica.

O *electrospinning* é uma técnica bastante versátil que permite a formação de nanofibras a partir de soluções de polímeros sintéticos ou naturais. Diversos fatores influenciam a formação e características das fibras por *electrospinning*, entre eles a composição da solução polimérica (e.g. tipo de polímeros, massa molecular e concentração do polímero, composição de solventes), parâmetros operacionais e condições ambientais. Assim, inicialmente foi feita uma otimização da matriz de PVA visando a aplicação no tratamento de feridas de pele. Para isso, soluções de PVA com diferentes pesos moleculares e diferentes concentrações foram avaliadas por meio da observação do efeito na estabilidade do processo de *electrospinning* e na formação de nanofibras, i.e. características macroscópicas e microscópicas da matriz formada.

Na figura 5 podemos observar o efeito do peso molecular do PVA na morfologia das fibras. As fibras de PVA 130 kDa (Fig. 5A) apresentam diâmetro médio bastante elevados comparadas com as obtidas a partir das outras amostras. Além disso, os diâmetros das fibras são bastante heterogêneos, i.e. distribuição de diâmetros com grande amplitude e apresentam *beads*. Já as fibras de PVA 85-125 kDa (Fig. 5B), apesar das fibras serem menores, há *beads* tão grandes que dificultam a observação das fibras formadas. A presença destas estruturas não fibrosas, i.e. *beads* e *clusters*, é devido a partes da solução polimérica que não foram estiradas. Este fenômeno ocorre quando não há entrelaçamentos suficientes entre as moléculas poliméricas de forma a originar uma estrutura fibrosa contínua e pode resultar de diversos fatores, como por exemplo, a baixa concentração de polímero em

solução, viscosidade da solução muito elevada, baixo peso molecular do polímero, entre outros (VELEIRINHO, 2007). Nos casos das soluções de PVA 130 kDa e 85-125 kDa, a elevada viscosidade da solução, i.e. maiores forças intermoleculares, torna mais difícil o aumento da área superficial que ocorre durante a formação das fibras. Consequentemente, ocorre maior instabilidade no processo de formação do cone de Taylor e no estiramento do jato, o que leva à formação de *beads* e/ou fibras com maior diâmetro. A matriz de PVA 89-98 kDa (Fig. C) apresentou grande quantidade de fibras uniformemente distribuídas e com o menor diâmetro, como pode ser observado em detalhe na figura 5D. A solução polimérica de 31-50 kDa apresentou grande instabilidade e não foi ilustrada.

Relativamente à variação da concentração de polímero em solução, verificou-se que, de maneira geral, o aumento da concentração de PVA originava fibras com maior diâmetro e diminuição do número de *beads* na matriz. No entanto, o aumento da viscosidade da solução com o aumento da concentração levava a um aumento da instabilidade do processo de *electrospinning*. Assim, a concentração de PVA 15% (m/V) foi que originou maior estabilidade no processo de *electrospinning* e menor formação de *beads* na matriz.

Para cada sistema polímero/solvente, a otimização das condições de processamento do processo de *electrospinning* é crucial para obter a morfologia das fibras pretendida. Assim, foi constatado que as condições de processamento do *electrospinning* que produzem as nanomatrizes com características que atendem melhor às necessidades requeridas são: fluxo de infusão de 0,02 mL/min, diferença de potencial de 20 kV, distância da agulha ao coletor de 12 cm e rotação do coletor de 200 rpm. Estas condições de processamento geraram um processo de *electrospinning* mais estável e com fibras morfologicamente mais adequadas à aplicação pretendida. As fibras de PVA 89-98 kDa na concentração de 15%, nas condições operacionais descritas, apresentaram diâmetro médio 311 ± 11 nm, com maior uniformidade de diâmetro, formato cilíndrico uniforme e menor número de *beads* e *clusters*. Macroscopicamente esta nanomatriz é homogênea, porosa e com espessura suficiente para os ensaios biológicos. Pelos motivos supracitados, esta matriz foi selecionada como nanomatriz padrão para a incorporação do extrato bioativo de própolis e será denominada por matriz T1 ao longo desse trabalho. A morfologia das nanofibras da matriz T1 está representada na figura 6.

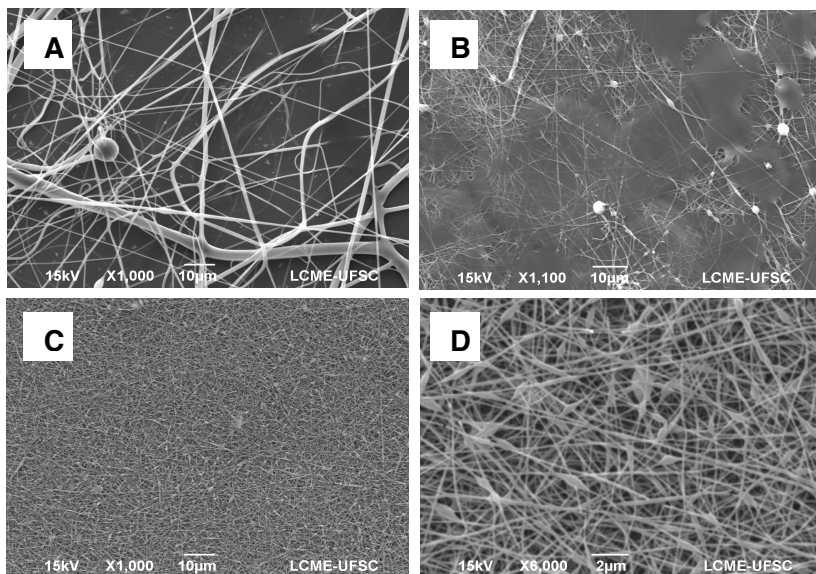


Figura 5 – Imagens de MEV de nanofibras produzidas por *electrospinning* a partir de soluções de PVA com diferentes pesos moleculares (concentração 10% (m/V) em água): (A) 130 kDa (B) 85-125 kDa (C,D) 89-98 kDa.

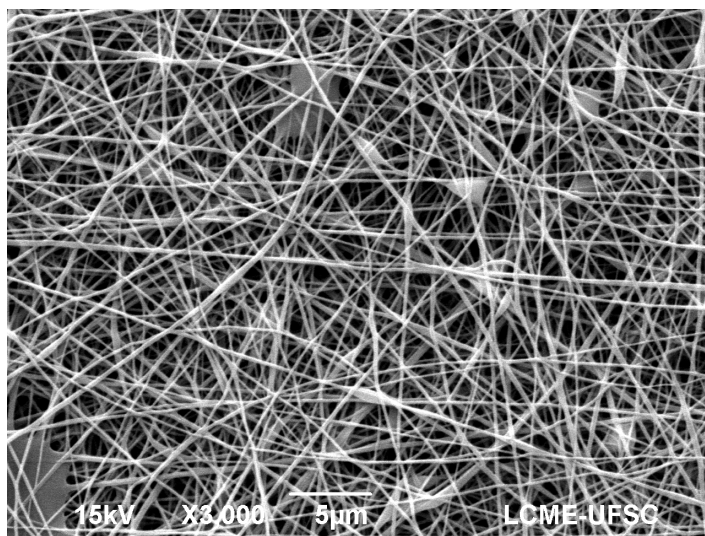


Figura 6 – Imagens de MEV de nanofibras produzidas por *electrospinning* a partir de soluções de PVA (concentração 15% (m/V) em água) de PM 89-98 kDa.

4.2 Associação do extrato de própolis à matriz de PVA

O objetivo central deste trabalho consistiu no desenvolvimento de uma matriz polimérica nanofibrosa associada ao extrato de própolis para o tratamento de feridas de pele. Tradicionalmente, a incorporação de compostos bioativos a matrizes nanofibrosas é feita através da adição do composto à solução polimérica submetida ao processo de *electrospinning*. Assim, durante o processo de *electrospinning*, quando ocorre a formação das nanofibras, os compostos bioativos ficam incorporados no interior da fibra. Posteriormente, quando as nanomatrizes são aplicadas na ferida (curativo) os compostos bioativos são liberados para o tecido em regeneração.

A concentração do extrato de própolis na solução polimérica (1,25 mg/mL) e posteriormente na nanomatriz formada por *electrospinning* (0,03 mg/cm²) e foi determinada com base em valores descritos na literatura por área de lesão experimental (PARK *et al.*, 1996) e extrapolação para a área total da nanomatriz.

A dissolução direta do extrato de própolis (seco) na solução de PVA não foi possível devido à insolubilidade do extrato em solução aquosa. Assim, foram estudadas diferentes estratégias de associação do extrato à matriz de PVA, conforme descrito em seguida.

4.2.1 Utilização de solventes coadjuvantes

Como referido anteriormente, a associação direta do extrato de própolis à solução de PVA 15% em água não foi possível. Levando em consideração que o extrato é hidroalcoólico, a primeira estratégia de incorporação da própolis à solução polimérica foi a associação do etanol como solvente coadjuvante. Assim, soluções de PVA 15% foram preparadas usando H₂O/EtOH em diferentes proporções (1:9, 2:8, 3:7, 5:5, 7:3, 8:2 e 9:1 V/V). Verificou-se que quanto maior a proporção de etanol na solução, maior a solubilidade do extrato de própolis. No entanto, o aumento do teor de etanol resultava no aumento da viscosidade da solução e no aumento da instabilidade do processo de *electrospinning*. Essa instabilidade, por sua vez, levava a diminuição da formação de fibras, sendo que para as concentrações mais elevadas de etanol (> que 10%) as fibras nem chegavam a se formar. Por isso, proporções de etanol superiores a 20% foram descartadas.

De forma a diminuir a concentração de etanol na solução polimérica, permitindo, no entanto, a solubilização do extrato de própolis, diferentes abordagens foram avaliadas:

A) Solubilização do extrato de própolis seco na solução polimérica preparada em H₂O/EtOH 9:1 V/V. Neste caso verificou-se a não-dissolução completa do extrato de própolis.

B) Solubilização do extrato de própolis em etanol H₂O/EtOH 9:1 V/V e posterior dissolução do polímero. Visto que a temperatura para dissolução do PVA em água é de cerca de 90°C e a temperatura máxima que a própolis deve ser submetida para manter suas propriedades é 45°C, apesar da dissolução completa, ela não é viável para os propósitos do estudo.

C) Adição de extrato de própolis previamente solubilizada em etanol H₂O/EtOH 9:1 V/V à solução polimérica preparada em etanol H₂O/EtOH 9:1 V/V. Neste caso foi possível co-solubilizar o extrato de própolis e o polímero; a solução foi utilizada para elaboração de nanomatrizes por *electrospinning*, a qual teve sua morfologia analisada, conforme será discutido posteriormente.

Outra estratégia estudada para viabilizar a incorporação do extrato de própolis à solução polimérica padrão, foi a utilização de polietilenoglicol (PEG) de baixo peso molecular (PM: 400_{kDa}) como adjuvante. Esse polímero foi escolhido principalmente por sua propriedade anfifílica, estabilidade e baixa toxicidade. O extrato de própolis foi solubilizado em PEG e adicionado nas concentrações de 1 e 2 %V/V à solução padrão de PVA. A solução contendo 2% de PEG permitiu maior solubilidade do extrato de própolis e maior estabilidade no processo de formação de fibras por *electrospinning*, comparativamente à de 1%.

Na tabela a seguir (Tabela 4) encontram-se descritos os solventes e proporções utilizadas para a dissolução do extrato de própolis e seu resultado (x negativo e v positivo). Adicionalmente, na figura 7 é possível observar a formação de fibras obtida com os solventes onde houve solubilização da própolis.

Tabela 4 - Solubilidade e formação de fibras de PVA com própolis em diferentes sistemas de solventes. (*Electrospinning* com rotação 200 rpm, voltagem de 20 kV, fluxo 0,02mL/min).

Solvente	Proporção	Solubilização Própolis	Formação de fibras
H ₂ O	100%	×	NA
H ₂ O/EtOH	3:7	×	NA
	1:1	×	
	7:3	×	
	8:2	×	
	9:1 (A)	✓	×
	9:1 (B)	✓	×
	9:1 (C)	✓	✓
H ₂ O/PEG	99:1	✓	✓
	98:2	✓	✓

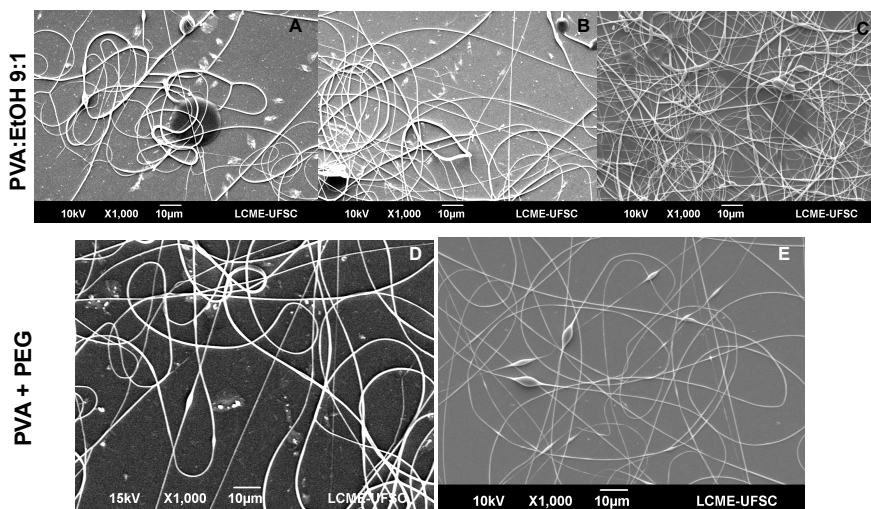


Figura 7 - Imagens de MEV das fibras obtidas a partir de solução de PVA 15% em: EtOH 9:1 sob os métodos de solubilização (A) , (B) e (C), PEG 1% (D) e PEG 2% (E).

4.2.2 Preparação e caracterização da nanoemulsão de própolis

Para permitir a adição do extrato de própolis à solução polimérica sem uso de solventes coadjuvantes - que podem, além de ter risco de toxicidade, prejudicar a estrutura dos compostos bioativos provenientes da própolis - foi preparada uma nanoemulsão de própolis usando a técnica de emulsificação espontânea. Além de permitir a solubilização de compostos apolares em meios aquosos, as nanoemulsões apresentam uma série de vantagens como o aumento da estabilidade e da permeação dos compostos nos tecidos. Isso ocorre devido ao tamanho, morfologia e propriedades físico-químicas da nanopartícula e sua associação com a superfície da pele. A lipofilicidade da nanoemulsão e o uso de surfactantes também aumenta o processo de permeação dos fármacos (FASOLO *et al.*, 2007). A necessidade da solubilização da própolis em meio aquoso é necessária não apenas para sua adição à solução polimérica, mas também para permitir a sua dissolução em meio de cultura visando a realização dos ensaios de cultura celular. Em vista disso, a nanoemulsão de própolis foi preparada conforme descrito anteriormente e apresentou boa solubilidade tanto na solução polimérica padrão, como em meio de cultura celular.

Existem diferentes maneiras de avaliar a estabilidade de uma nanoemulsão. A estabilidade de uma nanoemulsão pode ser observada macroscopicamente, pela ausência de fases e manutenção do aspecto original, e pela análise de suas características físico-químicas (TADROS *et al.*, 2004). A figura 8 mostra os resultados de tamanho de partículas da nanoemulsão de própolis, que apresentou tamanho médio de gotícula de 209,7 nm. A formulação apresentou distribuição bimodal, conforme evidenciado pelos dois picos na distribuição de tamanho de partícula (Figura 8). O índice de polidispersão foi de 0,385. Quanto maior o valor de polidispersão, menor é a uniformidade do tamanho das partículas da nanoemulsão. Esse valor é determinado pela proporção do desvio padrão e o tamanho médio das partículas. Índices menores que 0,2 são considerados baixos. Apesar de haver dois picos, de 139,1nm e 581,8 nm, a distribuição do tamanho de partículas entre eles é uniforme, se dividindo em 49,6% e 50,4%, respectivamente. A diferença do tamanho de gotícula está provavelmente relacionada à encapsulação das moléculas ativas.

O potencial Zeta, outro parâmetro avaliado, é utilizado para medir a carga da superfície das partículas. O valor do potencial zeta foi - 21,1 mV. Quanto mais elevados os valores de potencial zeta (tanto positivos quanto negativos), geralmente acima de 30 mV, maior é a repulsão eletroquímica entre as partículas e maior a estabilidade da

nanoemulsão. O potencial zeta negativo das nanoemulsões pode estar relacionado à presença da lecitina de soja que está preferencialmente localizada na superfície da nanoemulsão.

Por conseguinte, a nanoemulsão apresentou considerável estabilidade e encapsulamento das partículas de própolis evidenciado pelo aumento do tamanho de partículas.

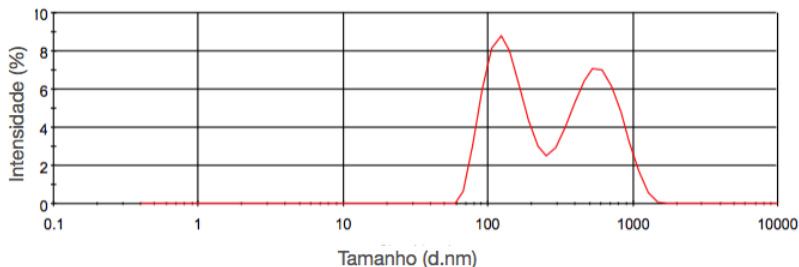


Figura 8-Distribuição do tamanho das partículas da nanoemulsão de própolis obtidos por espalhamento de luz dinâmico.

4.3 Caracterização das nanomatrices de PVA associadas ao extrato de própolis

A morfologia das fibras analisadas no MEV está demonstrada na figura 9. Seus diâmetros foram plotados num gráfico do tipo *scatter-plot* (Gráfico 1) e é possível observar a distribuição do tamanho das fibras das nanomatrices, bem como sua média e desvio padrão, que serão discutidos a seguir. A nanomatrix padrão

(Figura 10), i.e. somente com PVA 15% (T1), apresenta fibras com diâmetros que variam entre 111nm e 672nm (diâmetro médio de 311 ± 11 nm) e apresenta alguma formação de *beads*. As matrices com etanol (etanol –T2- e própolis solubilizada em etanol –T3- adicionada depois da solução polimérica pronta - 9:1 C) apresentaram grande variabilidade no diâmetro das fibras, as quais variaram de 282 a 984nm. A matriz T2 apresentou diâmetro médio de 313 ± 17 nm, enquanto a matriz T3 apresentou diâmetro médio de 273 ± 17 nm (significativamente menor do que o da matriz padrão de PVA). Entretanto, observando a morfologia da matriz no MEV é possível verificar que há menor número de fibras e formação numerosa de grandes *beads*, características indesejáveis à aplicação pretendida, i.e. curativo de pele.

As matrizes contendo 2% de PEG (T4 e T5) apresentaram fibras significativamente maiores em relação à matriz padrão somente com PVA (T1). A matriz T4 tem diâmetro médio de 498 ± 16 nm e a T5 de 372 ± 15 nm. A dispersão do diâmetro das fibras foi maior do que as demais, variando de 137nm a 955nm. Levando em consideração que há a adição de um segundo polímero na solução, é natural que o diâmetro das matrizes seja maior do que a matriz padrão somente de PVA (T1)(VELEIRINHO *et al.*, 2011). Verificou-se ainda que as fibras somente com PVA e PEG (T4) apresentaram poucos *beads*, enquanto a matriz com PEG associado a própolis teve grande quantidade de *beads*. Esse resultado é indicativo de que o sistema composto pelos dois polímeros é menos estável do ponto de vista termodinâmico. Assim, durante o processo de *electrospinning*, quando o solvente é evaporado e a concentração polimérica aumenta, pode ocorrer separação de fases e deposição de porções poliméricas que não foram estiradas (VELEIRINHO e LOPES-DA-SILVA, 2009).

As nanomatrizes com nanoemulsão (T6 e T7) apresentaram menor diâmetro das fibras e maior uniformidade da dispersão de diâmetros dentre todas as matrizes, sendo que o mínimo foi 120nm e o máximo 595nm. O diâmetro médio das fibras da matriz T1 foi de 259 ± 9 nm e foi significativamente menor do que da matriz padrão de PVA. A matriz de PVA com nanoemulsão branca (T6) apresentou mais *beads* do que a com nanoemulsão de própolis (T7). A matriz T2 teve diâmetro médio de 325 ± 7 nm, não apresentando diferença significativa entre a matriz padrão de PVA. Devido à nanoemulsão ser de base aquosa, ela não altera tanto a morfologia das fibras em relação à matriz padrão de PVA, o que é desejado quando se associa bioativos a um biomaterial. A nanoemulsão facilitou a solubilização do extrato de própolis e a sua incorporação nas nanofibras de PVA. Além disso, a análise da morfologia de suas fibras demonstrou menor diâmetro, maior homogeneidade e similaridade à matriz de PVA padrão. Morfologicamente, as nanofibras de PVA associadas à nanoemulsão de própolis apresentam maior potencial para serem aplicadas na regeneração tecidual dentre as matrizes analisadas neste trabalho.

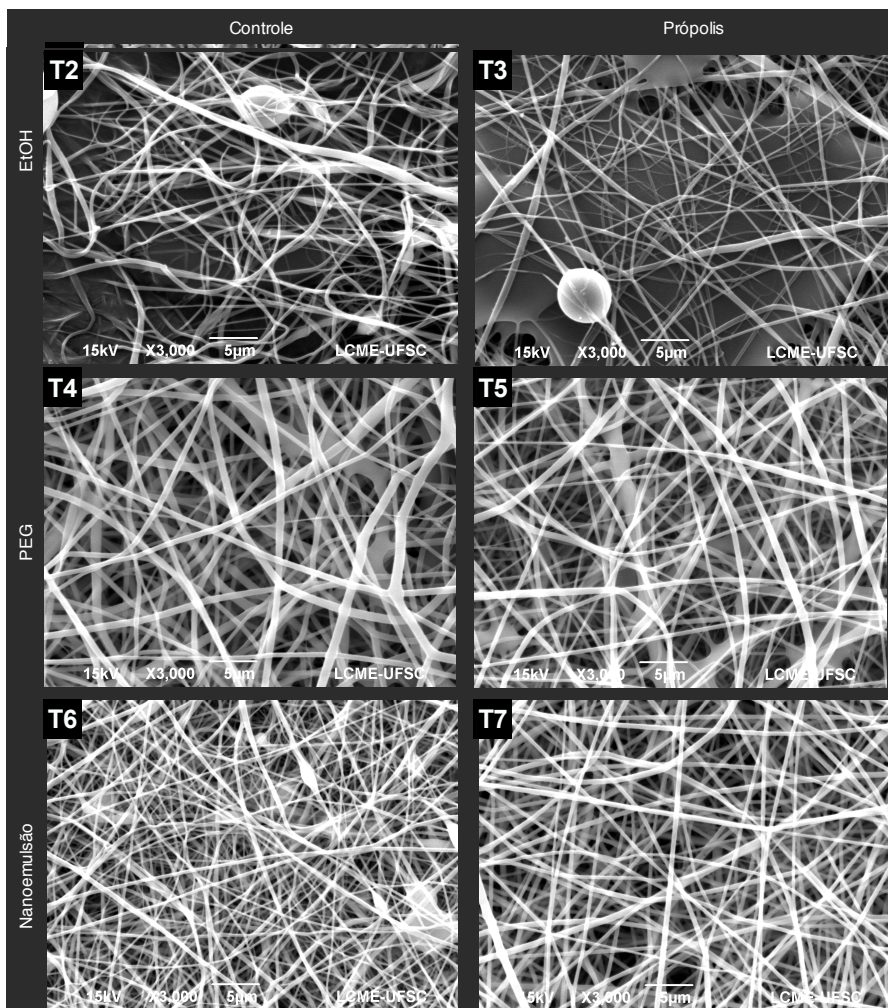


Figura 9 - Imagens de MEV das nanomatrizes PVA/EtOH 9:1 (T2), PVA/EtOH 9:1 C com própolis (T3), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7).

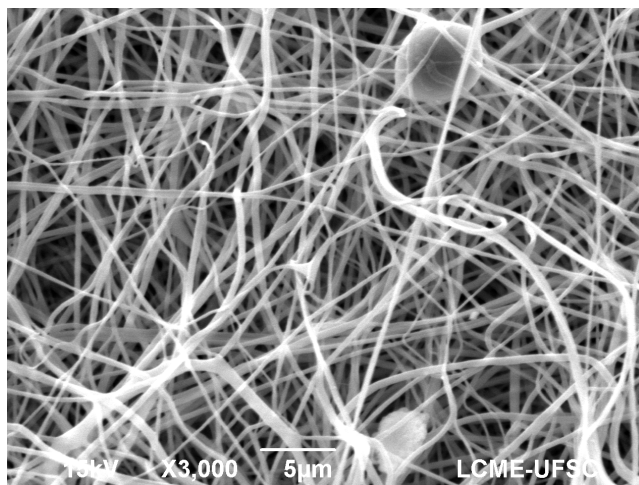


Figura 10 - Imagens de MEV da nanomatriz padrão de PVA (T1).

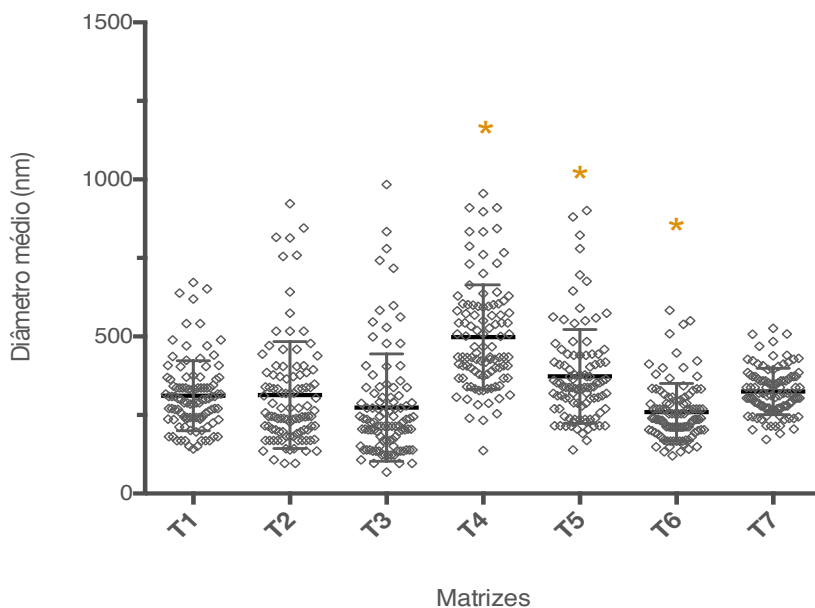


Gráfico 1—Gráfico do tipo *scatter-plot* mostrando os diâmetros (nm) médios e desvio padrão das fibras das nanomatrizes de PVA (T1), PVA/EtOH 9:1 (T2), PVA/EtOH 9:1 C com própolis (T3), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7).

4.4 Estudos de cultura celular

O extrato de própolis foi solubilizado com êxito na nanoemulsão, facilitando não apenas sua incorporação à matriz de PVA, mas também sua avaliação em estudos de cultura celular. Visto que as nanomatrizes foram desenvolvidas visando sua aplicação em cicatrização, neste trabalho foi feita uma primeira avaliação do seu potencial na aplicação pretendida através de ensaios de cultura celular.

4.4.1 Toxicidade oral aguda da nanoemulsão de própolis

O efeito da nanoemulsão de própolis na viabilidade de fibroblastos 3T3 foi avaliado pelo ensaio de toxicidade oral aguda (Gráfico 2). A nanoemulsão foi testada em concentrações logarítmicas e desde a menor concentração (0,001 mg/mL) apresentou aumento de 50% da viabilidade celular em relação ao controle. A melhor dose foi de 0,01 mg/mL, que aumentou a viabilidade celular em 50,29% em relação ao controle. O aumento da viabilidade celular é estatisticamente relevante até 0,1mg/mL, a maior dose antes do IC₅₀, a qual teve aumento de viabilidade celular de 47,71% em relação ao controle. A concentração máxima inibitória (IC₅₀) calculada foi 1,30 mg/mL, enquanto a dose letal (DL₅₀) foi de 1523,9 mg/kg, que corrobora a toxicidade descrita na literatura (PARK *et al.*, 1996).

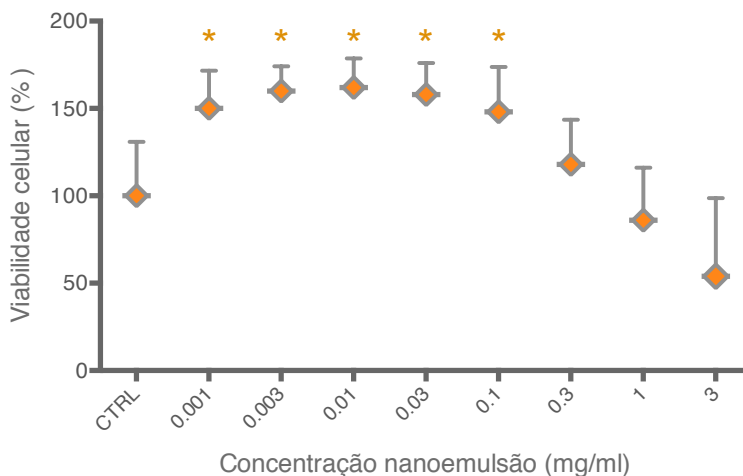


Gráfico 2 - Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de citotoxicidade oral aguda de células 3T3 por NRU com concentrações logarítmicas de nanoemulsão própolis (mg/mL).

Os métodos mais comuns de medida de citotoxicidade são baseados na leitura espectrofotométrica dos cristais produzidos por uma estrutura celular viável, como por exemplo, o teste de incorporação do vermelho neutro, que mostra a integridade lisossomal. Entretanto, a extração dos possíveis elementos ou compostos tóxicos é realizada em meio aquoso, dificultando a análise de certos materiais como as matrizes poliméricas. Portanto, foi medida a toxicidade indireta das matrizes produzidas com própolis (Gráfico 3).

A matriz de PVA + 2% PEG (T4) foi a única que apresentou diminuição da viabilidade celular comparada com as demais. A matriz T5, PVA + 2% PEG associada ao extrato de própolis, não apresentou citotoxicidade como a T4. Apesar de isso poder ser atribuído às propriedades biológicas da própolis, que podem ter anulado o efeito citotóxico do PEG, o ensaio não é suficiente para concluir a associação do efeito. Todas as outras matrizes não apresentaram potencial tóxico para as células. Entretanto, o aumento de viabilidade celular observado em todas as outras matrizes não é estatisticamente relevante em comparação com as células controle e tratadas com a nanomatriz padrão de PVA puro. Levando em consideração a citotoxicidade da matriz associada ao PEG, as matrizes de PVA associadas à nanoemulsão apresentaram o melhor potencial de uso como *scaffold* para reparação tecidual.

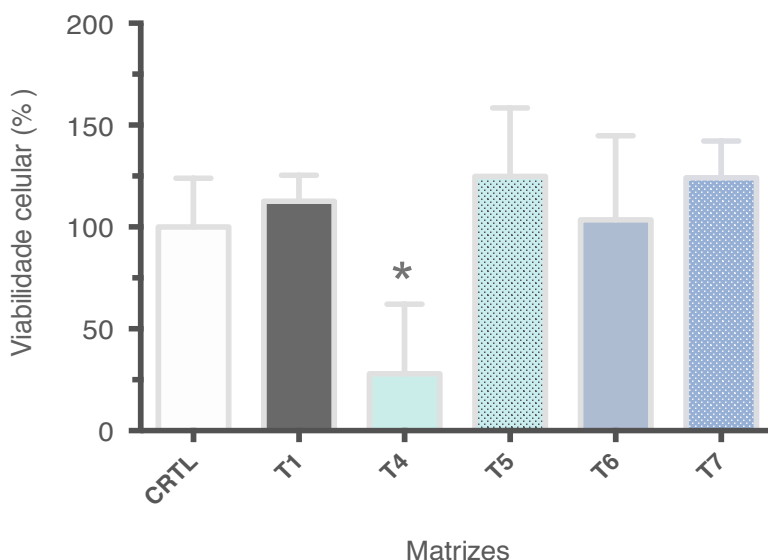


Gráfico 3 -Viabilidade celular (%) obtida no ensaio de citotoxicidade indireta de células 3T3 cultivadas em meio de cultura DMEM controle (CTRL) e meio de cultura das nanomatrizes de PVA (T1), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7).

Para avaliar o comportamento celular na matriz foi realizada a observação dos núcleos (DAPI) e dos filamentos de actina do citoesqueleto (faloídina) das células cultivadas sobre as matrizes (Figura 11). É importante salientar que os resultados obtidos neste ensaio são preliminares, devido à dificuldade em obter imagens microscópicas de boa qualidade para este tipo de biomateriais.

Nas imagens das células controle é possível observar que estas se distribuem homogeneamente sobre a placa, entretanto, o mesmo não ocorre com os biomateriais. Devido a características inerentes ao material, e.g. topografia irregular, enrugamento em solução aquosa, porosidade, as células ficam em vários planos. Assim, uma região sem marcação na imagem pode significar simplesmente que as células estão em outro plano. Apenas a análise em tempo real permite visualizar todos os planos que contêm células. Da mesma forma que uma concentração de marcações pode ser devido à contração do material durante a preparação, formando rugosidades que sobrepõem células uma sobre as outras. As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência comum. Um microscópio de fluorescência confocal permitiria a obtenção de imagens com maior qualidade. Apesar disso, embora não seja possível a comparação detalhada entre as nanomatrizes e uma observação mais pormenorizada da morfologia das células, ainda é possível observar que houve adesão e crescimento celular em todos os biomateriais analisados. Assim, podemos inferir o potencial positivo do uso das nanomatrizes analisadas como suporte de crescimento celular para regeneração tecidual.

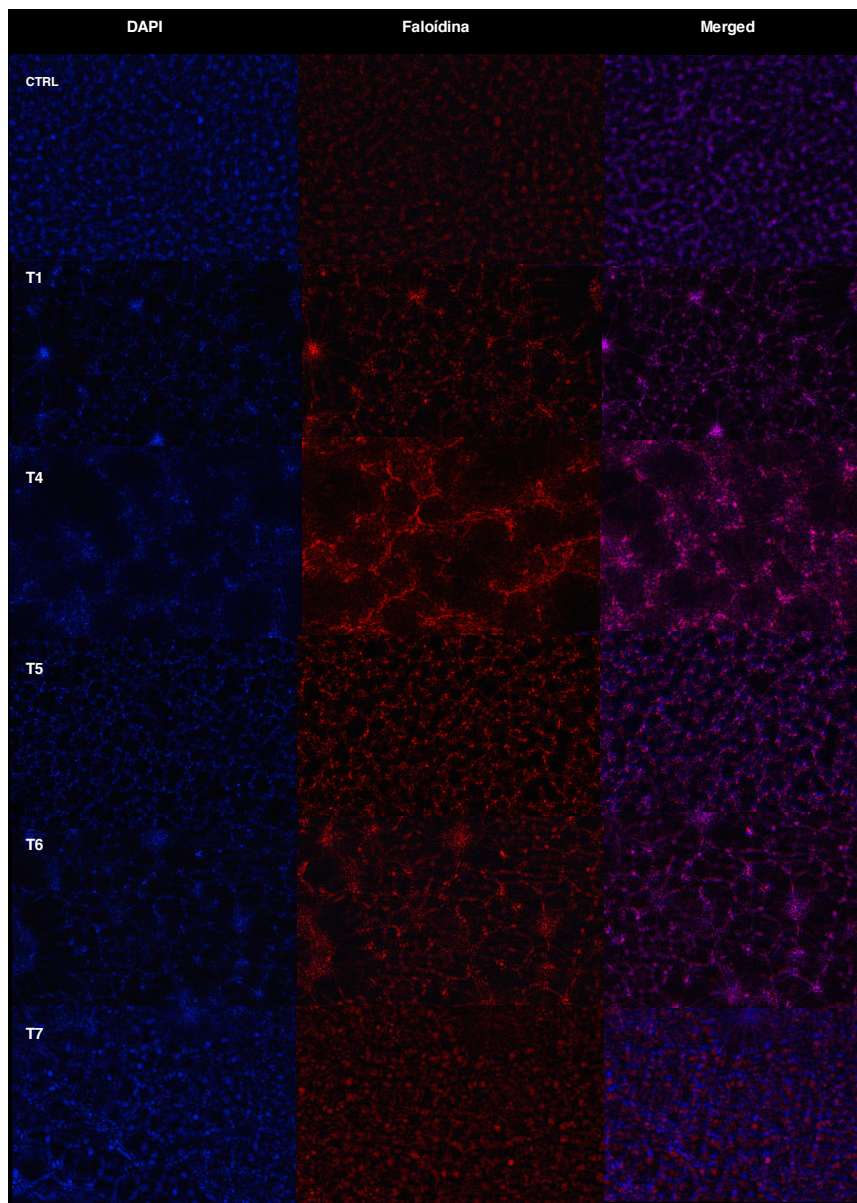


Figura 11 - Fibroblastos 3T3 cultivados em nanomatrizes de PVA (T1), PVA/PEG 2% (T4), PVA/PEG 2% com própolis (T5), PVA/nanoemulsão branca (T6) e PVA/nanoemulsão com própolis (T7), por 48h. Núcleos (azul) e F-actina (vermelho) marcados por faloidina e DAPI, respectivamente.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Todos os objetivos deste trabalho foram cumpridos com sucesso. A seleção dos sistemas polímero/solvente e condições de processamento do *electrospinning* foi realizada com êxito, na qual se determinou que o polímero PVA de peso molecular 89-98 kDa, na concentração 15% e condições de processamento com fluxo de infusão a 0,02mL/min, diferença de potencial de 20kV, distância da agulha ao coletor de 12cm e rotação de 200 rpm apresentaram os melhores resultados.

O desenvolvimento das matrizes foi realizado através da técnica de *electrospinning*, na qual biomateriais poliméricos nanofibrosos baseados em PVA foram associados ao extrato de própolis por meio da manipulação de sistemas de solventes. Com base na solubilidade do própolis foram selecionados os solventes água/etanol na proporção 9:1 V/V, PEG 2% e a nanoemulsão. A avaliação da morfologia das fibras eliminou a matriz associada ao etanol como potencial *scaffold* para regeneração tecidual. A interação dos biomateriais com linhagens celulares epiteliais (fibroblastos) foi analisada visando adequar estes materiais à regeneração tecidual. O aumento da viabilidade celular medida por NRU demonstrou o potencial da nanoemulsão de própolis para o fim pretendido. Já o resultado dos estudos de citotoxicidade indireta das matrizes excluiu a nanomatriz de PVA+ PEG 2%.

Todos os resultados obtidos corroboraram o potencial das nanomatrizes de PVA associadas à nanoemulsão de própolis. A nanoemulsão facilitou a solubilização do extrato de própolis tanto para a associação à matriz quanto para os estudos de cultura celular. A nanoemulsão de própolis aumentou a viabilidade celular *in vitro* e apresentou baixa citotoxicidade. A morfologia das fibras da nanomatriz associada à nanoemulsão de própolis demonstrou menor diâmetro, maior homogeneidade e similaridade à matriz de PVA padrão. Além disso, a matriz não apresentou citotoxicidade indireta e houve adesão e crescimento celular sobre as suas fibras.

Levando em consideração todos os resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que as matrizes de PVA associadas à nanoemulsão de própolis demonstraram maior potencial para serem aplicadas em regeneração tecidual.

É importante ressaltar que na literatura existe apenas um outro estudo que associa própolis a nanofibras (KIM *et al.*, 2014). No trabalho mencionado, a incorporação do extrato de própolis à fibras de poliuretano é realizada utilizando como solvente tetrahidrofurano e dimetilformamida, ambos solventes orgânicos que apresentam toxicidade ao ser humano. Mesmo com a evaporação dos solventes no *electrospinning*, ainda podem ficar resquícios que proporcionam um fator de risco associado ao material. Este trabalho apresenta como inovação o desenvolvimento do sistema de associação de nanofibras combinada com uma nanoemulsão. A dissolução da própolis na nanoemulsão evita o uso de solventes que, além do risco de toxicidade, pode prejudicar a estrutura dos compostos bioativos provenientes da própolis. Ademais, a nanoemulsão potencializa a liberação de ativos, principalmente os de uso tópico, devido à morfologia das partículas e sua associação com a superfície epitelial. Esse sistema pode ser utilizado não apenas para o própolis, mas para qualquer sistema de nanofibras associado a extratos, especialmente os insolúveis em água.

Neste estudo, conseguimos otimizar e selecionar uma matriz com baixa citotoxicidade e alto potencial para ser utilizada em cicatrização. Entretanto, ainda existem estudos a serem realizados para comprovar seu efeito cicatrizante *in vivo* e *in vitro*, além de estudar mais a fundo propriedades da matriz em si. Enumeramos como perspectivas futuras nessa área a avaliação das propriedades de superfície da matriz, bem como ensaios *in vitro* de estabilidade, biodegradabilidade e de liberação controlada dos compostos ativos em sistema Dubinoff, mimetizando as condições fisiológicas. Além disso, seria interessante a

realização de microscopia eletrônica de transmissão para observar o interior das fibras e comprovar a incorporação das nanopartículas da nanoemulsão dentro das nanofibras de PVA. Em relação aos estudos de potencial de cicatrização, poderiam ser realizados primeiramente ensaios *in vitro* como a análise da proliferação celular por citometria de fluxo e ensaio de *wound healing (scratch)*. Como ensaio *in vivo*, o modelo de regeneração de pele em rato diabético com cicatrização não contrátil descrito por (WANG *et al.*, 2013) pode ser um bom modelo para avaliar o potencial do curativo em regeneração tecidual de indivíduos com cicatrização comprometida, que é a meta final do desenvolvimento da nanomatriz.

REFERÊNCIAS

- ABAI, B.; THAYER, D.; GLAT, P. M. Two cases of traumatic wounds in patients with Ehlers-Danlos syndrome successfully treated with a bioengineered skin equivalent. **Wounds**, v. 15, n. 6, p. 201-207, 2003.
- AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
- ALIPOUR, S. M. et al. Electrospinning of poly(vinyl alcohol)–water-soluble quaternized chitosan derivative blend. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 18, p. 2496-2501, 2009.
- AN, J. et al. Advanced nanobiomaterial strategies for the development of organized tissue engineering constructs. **Nanomedicine**, v. 8, n. 4, p. 591-602, 2013.
- ARAMWIT, P. et al. Formulation and characterization of silk sericin–PVA scaffold crosslinked with genipin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 5, p. 668-675, 2010.
- ARNOLD, M.; BARBUL, A. Nutrition and Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7S, p. 42S-58S, 2006.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 114-117, 2005.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.
- BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-22, 2009.
- BARNES, C. P. et al. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 14, p. 1413-1433, 2007.

BEANES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, n. 08, p. 1-22, 2003.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653-3680, 2015.

BOUDREAU, N.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 5, p. 640-646, 1998.

BROUGHTON, G. I.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7S, p. 12S-34S, 2006.

BROWN, N. H. Cell–cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. **Matrix Biology**, v. 19, n. 3, p. 191-201, 2000.

CAI, Z.-X. et al. Fabrication of Chitosan/Silk Fibroin Composite Nanofibers for Wound-dressing Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3529-3539, 2010.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, p. 51-58, 2007.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, Supplement 1, p. S1-S6, 2002.

CHOI, J. S.; LEONG, K. W.; YOO, H. S. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). **Biomaterials**, v. 29, n. 5, p. 587-596, 2008.

COTRAN, R. S. et al. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Saunders, 1999.

DOS SANTOS PEREIRA, A.; SEIXAS, F. R. M. S.; DE AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 651-662, 2015.

EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 91-96, 2004.

FASOLO, D. et al. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 5, p. 1174-1177, 2007.

GHISALBERTI, E. et al. Constituents of propolis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 34, n. 2, p. 157-158, 1978.

GODBOUT, J.; GLASER, R. Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 421-427, 2006.

GOREN, I. et al. Severely Impaired Insulin Signaling in Chronic Wounds of Diabetic ob/ob Mice : A Potential Role of Tumor Necrosis Factor- α . **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 3, p. 765-777, 2006.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and Wound Healing. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 321-326, 2004.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

HEHENBERGER, K.; HANSSON, A. High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors. **Cell Biochemistry and Function**, v. 15, n. 3, p. 197-201, 1997.

HENSHAW, F. R. et al. Topical application of the bee hive protectant propolis is well tolerated and improves human diabetic foot ulcer healing in a prospective feasibility study. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 28, n. 6, p. 850-857.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.

KIM, J. I. et al. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 52-57, 2014.

KONISHI, S. et al. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**, v. 75, p. 22-25, 2004.

LLOYD, A. W. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. **Medical device technology**, v. 13, n. 1, p. 18-21, 2001.

LOTIFY, M. et al. Combined use of honey, bee propolis and myrrh in healing a deep, infected wound in a patient with diabetes mellitus. **Br J Biomed Sci**, v. 63, n. 4, p. 171-173, 2006.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 437-441, 1998.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MANSUR, H. S.; ORÉFICE, R. L.; MANSUR, A. A. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, n. 21, p. 7193-7202, 2004.

MARASCHIN, M. et al. **Metabolomics and Chemometrics as Tools for Chemo (bio) diversity Analysis-Maize Landraces and Propolis**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MCLENNAN, S. V. et al. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 706-713, 2008.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**, v. 88, p. 1-11, 2013.

MOURA, S. A. L. D. et al. Aqueous extract of Brazilian green propolis: primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8, p. 762-798, 2007.

NATORI, J. et al. The influence of hypothyroidism on wound healing An experimental study. **Journal of Nippon Medical School**, v. 66, n. 3, p. 176-180, 1999.

NUTTELMAN, C. R. et al. Attachment of fibronectin to poly (vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. **Journal of biomedical materials research**, v. 57, n. 2, p. 217-223, 2001.

OECD, E. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. **OECD Ser. Test. Assess.**, v. 20, p. 1-54, 2010.

PAL, K.; BANTHIA, A.; MAJUMDAR, D. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 1, p. E142-E146, 2007.

PARK, E.-H.; KIM, S.-H.; PARK, S.-S. Anti-inflammatory activity of propolis. **Archives of pharmacal research**, v. 19, n. 5, p. 337-341, 1996.

PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. D. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 58, n. 9, p. 3-7, 2000.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. **Tissue engineering**, v. 12, n. 5, p. 1197-1211, 2006.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, Â. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. Academic press, 2004.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 216, 1996.

ROBSON, M. C.; STEED, D. L.; FRANZ, M. G. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Current Problems in Surgery**, v. 38, n. 2, p. A1-140, 2001.

SAILAJA, G. S. et al. Bioinspired mineralization and cell adhesion on surface functionalized poly(vinyl alcohol) films. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1647-1655, 2009.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANGHI, R.; SINGH, V. **Green chemistry for environmental remediation**. John Wiley & Sons, 2012.

SEN, C. K. et al. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 957, n. 1, p. 239-249, 2002.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989-2006, 2008.

STANDARDIZATION, I. O. F. **ISO 10995: 2008: Quality Management Systems-Requirements**. International Organization for Standardization, 2008.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303-318, 2004.

THAKUR, R. A. et al. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 87-93, 2008.

TOPPO, F. A.; PAWAR, R. S. NOVEL DRUG DELIVERY STRATEGIES AND APPROACHES FOR WOUND HEALING MANAGERMENTS. **Journal of Critical Reviews**, v. 2, n. 2, 2015.

VELEIRINHO, B. et al. Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly (ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 37-46, 2013.

VELEIRINHO, B. et al. Foreign body reaction associated with pet and pet/chitosan electrospun nanofibrous abdominal meshes. **PloS one**, v. 9, n. 4, 2014.

VELEIRINHO, B. et al. Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. **International journal of biological macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 343-350, 2012.

VELEIRINHO, B.; LOPES-DA-SILVA, J. Application of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mat to apple juice clarification. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 353-356, 2009.

VELEIRINHO, B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers. **Materials Letters**, v. 65, n. 14, p. 2216-2219, 2011.

VELEIRINHO, M. B. D. R. Desenvolvimento de membranas nanofibras por electrospinning: potencial aplicação na clarificação de sumos. 2007.

VILLANOVA, J. C.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, X. et al. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 2, p. 302-309, 2013.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.